Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut
Abteilung: Biochemie der Pflanzen
der Georg-August-Universität Göttingen

ÜBER DIE HEMMUNG PHOTOSYNTHETISCHER REAKTIONEN DURCH DISALICYLIDENDIAMINE UND DIE ISOLIERUNG VON PLASTOCHINONEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Diplom-Chemiker
MANFRED BURBA
aus Bomlitz / Hann.

Göttingen 1967

Druck und Schreibsatz: Andreas Funke, Offsetdruck,
34 GÖTTINGEN, Paulinerstr. 13
Eingang Gotmarstraße

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut
Abteilung: Biochemie der Pflanzen
der Georg-August-Universität Göttingen

ÜBER DIE HEMMUNG PHOTOSYNTHETISCHER REAKTIONEN DURCH DISALICYLIDENDIAMINE UND DIE ISOLIERUNG VON PLASTOCHINONEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Diplom-Chemiker
MANFRED BURBA
aus Bomlitz / Hann.

Göttingen 1967

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Professor Dr. A. Trebst
Korreferent: Professor Dr. H. Brockmann

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Mai 1967

Die vorliegende Arbeit wurde im Pflanzenphysiologischen Institut, Abt.: Biochemie der Pflanzen der Universität Göttingen in der Zeit vom März 1964 bis zum Dezember 1966 ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. Trebst danke ich herzlich für die Förderung dieser Arbeit durch Anleitung und Diskussion.

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einleitung 1

B. Disalicylidenverbindungen als Hemmstoffe des photosynthetischen Elektronentransportes

1) Theoretischer Teil 5
2) Ergebnisse: 6
a) Darstellung einiger Disalicylidenverbindungen 7
b) Reaktionen mit isolierten Chloroplasten 9
c) Reaktionen mit intakten Chlorellazellen 10
d) Reaktionen mit angereicherter Nitrit- und Nitratreduktase 11
3) Diskussion 19
4) Beschreibung der Versuche 24

C. Über die Isolierung und Eigenschaften einiger neuer p-Benzochinone aus Fliederblättern

1) Theoretischer Teil 30
2) Ergebnisse:
a) Aufarbeitung und Trennung von p-Benzochinonen aus Fliederblättern und Spinatchloroplasten 33
b) Chemische und physikalische Eigenschaften der aus Flieder und Spinat isolierten Chinone im Vergleich mit Modellsubstanzen
Dünnschichtchromatographie 34
Farbreaktionen 41
UV-Spektroskopie 45
IR-Spektroskopie 49
NMR-Spektroskopie 50
c) Synthesen einiger p-Benzochinone mit isoprenoider Seitenkette 53
3) Diskussion 56
4) Beschreibung der Versuche 61

D. Zusammenfassung 73

E. Literaturverzeichnis 75

Einleitung

Die seit etwa 1860 bekannte Summengleichung der Photosynthese

$$H_2O + CO_2 \xrightarrow[\text{Chlorophyll}]{h\cdot\nu} (CH_2O)_x + O_2$$

läßt sich in eine Licht- und eine Dunkelphase einteilen.
In den Chloroplasten laufen beide Phasen getrennt voneinander ab; die Lichtphase im Lamellarsystem und die Dunkelphase in der Matrix. Die Chloroplasten lassen sich nach einem Verfahren von Arnon[1] in funktionsfähigem Zustand isolieren, so daß in ihnen die photosynthetische Aktivität in vitro untersucht werden kann.
Während nun die Reaktionen der Dunkelphase durch die Arbeiten Calvins seit 1945 im wesentlichen bekannt sind, sind die lichtabhängigen Reaktionen im Detail noch unbekannt.
Das Prinzip dieser nur unter Beteiligung des Lichtes ablaufenden Reaktionen ist die Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie in Form von ATP und in Reduktionsäquivalente in der Form des NADPH. Beide Verbindungen werden zur Reduktion des in der Dunkelphase fixierten Kohlendioxids und damit zum Aufbau von Kohlenhydraten benötigt.
In der Lichtphase wird in einer lichtabhängigen Reaktion Wasser zu Sauerstoff oxydiert. Die freigesetzten Elektronen werden über eine Reihe von Redoxkatalysatoren in einem Elektronentransportsystem zur Reduktion von NADP verwendet:

$$H_2O + NADP \longrightarrow NADPH_2 + 1/2\ O_2$$

In dieser Reaktion bildet sich eine stöchiometrische Menge ATP. Die ATP-Bildung ist an das Elektronentransportsystem gekoppelt.

Das Auffinden neuer Redoxkatalysatoren und deren eindeutige Lokalisation innerhalb der Kette, die Festlegung der Phosphorylierungsstelle und schließlich die Aufklärung detaillierter Mechanismen sind wesentliche Aufgabengebiete der Photosynthese.

Unter den Redoxkatalysatoren, die in der Photosynthese beteiligt sind, befinden sich Chlorophylle, Cytochrome, das Ferredoxin, ein Flavinenzym, Plastochinone, das Plastocyanin und NADP. Einige dieser Cofaktoren, auf deren Biochemie und Funktion in den folgenden Teilen der Arbeit näher eingegangen wird, seien hier etwas ausführlicher beschrieben.

Ferredoxin

Das Ferredoxin ist ein obligatorischer Cofaktor bei der Reduktion von NADP mit Chloroplastenfragmenten. Es handelt sich um ein wasserlösliches, niedermolekulares Protein mit einem Redoxpotential von -420 mV, das beim Ansäuern dreiwertiges Eisen und Schwefelwasserstoff abspaltet. Die Aminosäuresequenz der Verbindung ist bekannt[2]. Über die Chemie der prosthetischen Gruppe lassen sich bisher keine Angaben machen. Ferredoxin vermittelt zwischen dem partikulären Elektronentransportsystem der Chloroplasten und dem NADP. Seine Einordnung in die Kette als Katalysator nach der ersten Lichtreaktion (Abb.1 S.3) bereitete deshalb keine Schwierigkeiten.

Plastochinone

Die Beteiligung des von Kofler[3] 1946 isolierten und von Kofler[4] und Trenner[5] 1959 aufgeklärten 2,3-Dimethyl-solanosyl-1,4-benzochinon (Plastochinon-9) in der Photosynthese wurde durch die Petrolätherextraktionsversuche von Bishop[6] gesichert. Die Einordnung der Verbindung in das Elektronentransportsystem zwischen die beiden Lichtreaktionen folgte aus spektroskopischen und biochemischen Untersuchungen. Da sowohl die photosynthetische NADP-Reduktion als auch die cyclische Photophosphorylierung plastochinonabhängig sind, stellt das Plastochinon-9 offenbar die Verbindung zwischen der zweiten Lichtreaktion und dem cyclischen System her. Die Beteiligung weiterer von Crane et al[7] aufgefundener Plastochinone an der Photosynthese ist noch nicht geklärt.

Plastocyanin

Plastocyanin ist von Katoh[8] in Chloroplasten und Algen entdeckt und daraus isoliert worden. Es handelt sich um ein kupferhaltiges Protein mit niederem Molekulargewicht. Nach den Versuchen von Katoh mit digitoninfragmentierten Chloroplasten und aus spektroskopischen Befunden ist es zwischen Plastochinon-9 und Cytochrom f einzuordnen. Die Reihenfolge der Anordnung mit dem Cytochrom f ist aufgrund neuerer Untersuchungen an Mutanten von Chlamydomonas durch Levine[9] wieder umstritten.

Bei der Festlegung der Sequenz dieser Redoxkatalysatoren innerhalb des Elektronentransportsystems sind Hemmstoffe von großer Bedeutung. Erlauben sie doch bestimmte Teilstücke der Kette zu blockieren und mit Hilfe künstlicher Elektronendonatoren und -akzeptoren deren Cofaktorbedürfnis getrennt zu untersuchen.
Für den lichtabhängigen Teil der Photosynthese hat sich gegenwärtig aufgrund von spektroskopischen und biochemischen Versuchen mit Hemmstoffen und künstlichen Elektronendonatoren sowie aus Versuchen mit Mutanten und Kenntnis der Redoxpotentiale der beteiligten Verbindungen folgendes Schema ergeben:

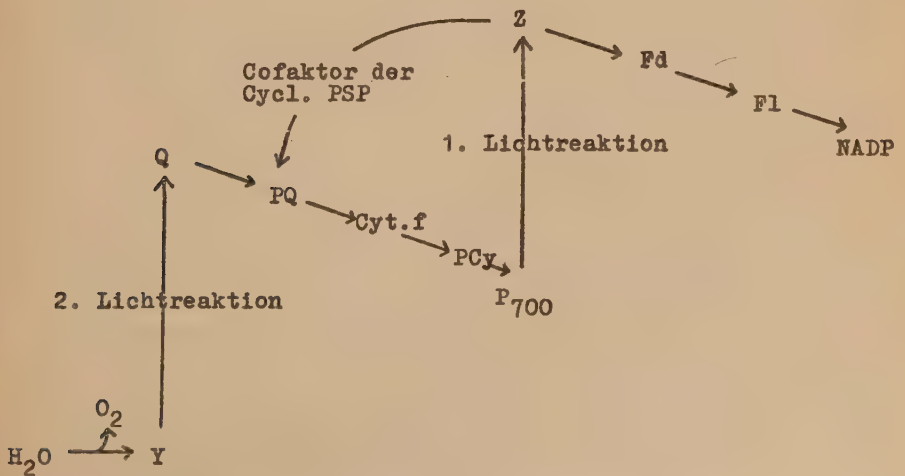


Abb.1: Elektronentransportkette der Photosynthese

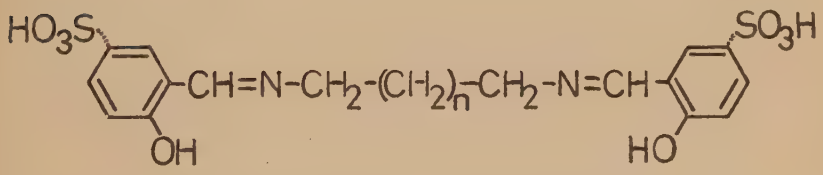
Unsicherheiten bestehen bei der Festlegung der ATP-Bildungsstelle. Die Substanzen Y, Z und Q sind bisher rein hypothetischer Natur. Die Sequenz Plastochinon-9 - Cytochrom f ist noch nicht hinreichend gesichert. Die Kopplung der beiden Lichtreaktionen bedarf weiterer Untersuchungen. Die Rolle des Chlorophyll b, des Cytochrom b_6 und der Plastochinone B-D in der Photosynthese ist nicht klar. Über den Mechanismus der ATP-Bildung gibt es gewisse experimentell fundierte Vorstellungen; der Mechanismus der Wasserspaltung (Photolyse des Wassers) hingegen ist vollständig ungeklärt.
Die derzeitigen Kenntnisse über den Mechanismus der Photosynthese sind unter diesen Voraussetzungen als vorläufig und noch sehr stark in der Entwicklung begriffen anzusehen.

Es war das Ziel der folgenden Arbeit, verschiedene synthetisch erhaltene Disalicylidenverbindungen an plastocyanin-abhängigen photosynthetischen Reaktionen auf ihre Hemmwirkung bezüglich dieses Cofaktors zu untersuchen.
Außerdem sollten durch gründliche Extraktion von Fliederblättern (Syringa vulgaris) alle in dieser Species enthaltenen Plastochinone ermittelt und soweit möglich Angaben über ihre chemische Konstitution gemacht werden.

Disalicylidenverbindungen als Hemmstoffe des photosynthetischen Elektronentransportes

Theoretischer Teil

Trebst und Eck[10] berichteten 1963 über die Hemmung photosynthetischer Reaktionen durch Salicylaldoxim, einem Kupferkomplexbildner. Aus diesen Versuchen ließ sich auf die Beteiligung eines kupferhaltigen Enzyms in der Photosynthese schließen. Es handelt sich mit großer Wahrscheinlichkeit um das von Katoh[8] aus Chloroplasten und Algen isolierte Plastocyanin. Salicylaldoxim hemmt allerdings die Photosynthese erst bei relativ hohen Konzentrationen (10^{-2} m), so daß es zweckmäßig erschien, empfindlichere Kupferkomplexbildner zu synthetisieren, um sie an Stelle des Salicylaldoxims zur Hemmung plastocyanin-abhängiger photosynthetischer Reaktionen zu verwenden.
Disalicylidenverbindungen, die in der Petroleum-Industrie als Antioxydantien gegen Spuren von Kupfer wirksam sind, boten sich an[11].

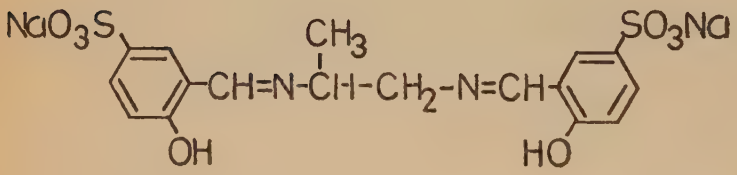


N,N'-Disalicyliden-diamin

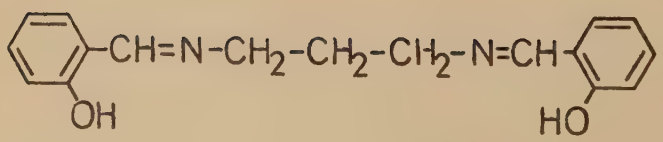
Es erschien deshalb aussichtsreich, diese Verbindungsklasse zur Hemmung des endogenen Kupferproteins der Chloroplasten, des Plastocyanins, heranzuziehen.
Im folgenden Teil dieser Arbeit wird nun der Einfluß verschiedener synthetisch dargestellter Disalicylidenverbindungen auf Photosynthetische Reaktionen in isolierten Chloroplasten und Algen bzw. auf Enzymreaktionen untersucht.

Ergebnisse

Das Disalicylidenäthylendiamin und die beiden Disalicylidenpropandiamine sind im Handel erhältlich. Die höheren Homologen und die Disulfonsäure der Disalicylidenverbindungen wurden durch Kondensation von Salicylaldehyd bzw. 5-Sulfosalicylaldehyd mit dem entsprechenden Diamin hergestellt. Zur Untersuchung der Hemmwirkung auf Reaktionen isolierter Chloroplasten wurde die wasserlöslichen Natriumsalze der Disulfonsäure der Disalicylidendiamine (z.B. N,N'-Disalicyliden-1,2-diaminopropan-5,5'-disulfonsäure = Sulfo-DSPD-(1,2) (XIV)); für die Versuche mit intakten Chlorellazellen dagegen das lipidlösliche Diamin ohne Sulfogruppen (z.B. N,N'-Disalicyliden-1,3-diaminopropan = DSPD-(1,3) (II)).



Sulfo-DSPD-(1,2)
(XIV)

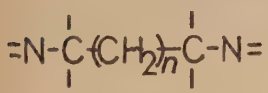
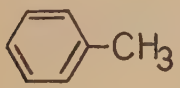
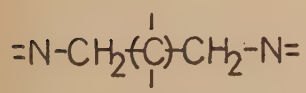
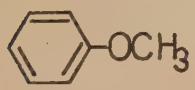
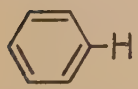
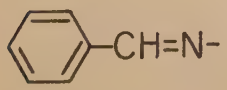
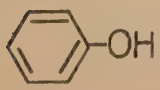


DSPD-(1,3)
(II)

Darstellung einiger Disalicylidenverbindungen

Disalicylidenverbindungen sind durch Kondensation von Salicylaldehyd mit Diaminen in alkoholischer Lösung leicht zugänglich[12]. Die Ausbeuten liegen zwischen 50 und 80% d.Th. Die Verbindungen werden aus Essigester, Äthanol oder Wasser umkristallisiert bzw. nach mehrmaligem Waschen mit Äther amorph erhalten. Sie sind in der Kälte schlecht wasserlöslich. Die Konstitution der Verbindungen wurde aus den NMR-Spektren ermittelt. Die folgende Tabelle 1 zeigt die Lage der verschiedenen Protonensignale.

Tabelle 1: Lage der Protonensignale in den NMR-Spektren von Disalicylidenverbindungen in verschiedenen Lösungsmitteln

Struktur	Lösungsmittel $CDCl_3$ δ (ppm)	NaOD δ (ppm)	CF_3CO_2D δ (ppm)
	1,2 - 1,7		
	2,1		
	3,5 - 3,9		
	3,97		
	6,6 - 7,6	6,4 - 7,0	7,2 - 8,2
	8,3 - 8,8	9,9 - 10,1	9,2
	13,0 - 13,8		

Zur Veranschaulichung der Tabelle 1 (S.7) folgt hier als Beispiel die vollständige Abbildung des NMR-Spektrums von N,N'-Disalicyliden-1,6-diamino-hexan (V) aufgenommen in $CDCl_3$.

Abb.2: NMR-Spektrum des N,N'-Disalicyliden-1,6-diamino-hexan

Die Darstellung von sulfosäure-substituierten Disalicyliden-verbindungen gelang durch Kondensation von 5-Sulfosalicyl-aldehyd, der aus 5-Sulfosalicylsäure durch Reduktion mit Natriumamalgam erhalten wurde[13], mit Diaminen wie oben (S.7) beschrieben. Die Ausbeuten betrugen 15-30% d.Th. Sämtliche Verbindungen konnten nur amorph erhalten werden. Sie sind sehr gut wasserlöslich und geben mit Schwermetallionen farbige Komplexe.

Reaktionen mit isolierten Chloroplasten

Zur Lokalisation der Hemmstelle der Disalicylidenverbindungen wurden verschiedene photosynthetische Reaktionen isolierter Chloroplasten untersucht. Bei einer Konzentration von 10^{-3} m hatten die Disalicylidenverbindungen keinerlei Einfluß auf eine Hill-Reaktion mit K-Ferricyanid (gemessen wurde O_2-Entwicklung und gekoppelte ATP-Bildung) und die cyclische Photophosphorylierung mit Menadion oder PMS als Cofaktor.
In Tabelle 2 (S.12) ist das Verhalten von Sulfo-DSPD-(1,2) stellvertretend für alle Disalicylidenverbindungen angegeben. Auch die pseudocyclische Photophosphorylierung mit Anthrachinonsulfonsäure und die chinon-stimulierte Ascorbat-Photooxydation (in der pseudocyclischen Photophosphorylierung beträgt die Stöchiometrie von aufgenommenem O zu ATP 1:1, in der chinon-stimulierten Ascorbat-Photooxydation 2:1 [14]) werden selbst durch $2 \cdot 10^{-3}$ m Sulfo-DSPD-(1,2) nicht gehemmt (Tabelle 3 S.12). Dagegen hemmt Sulfo-DSPD-(1,2) die photosynthetische NADP-Reduktion. Die Hemmung der NADPH-Bildung beträgt bei 10^{-3} m Sulfo-DSPD-(1,2) bereits 83% (Tabelle 4 S.13). Diese Hemmung wird durch Zusatz des künstlichen Elektronendonators DCPIP nicht aufgehoben (Tabelle 4 S.13).

Nach Losada[15] ist die photosynthetische Nitritreduktion wie die NADP-Reduktion ferredoxin-abhängig. Es wurde deshalb der Einfluß von Sulfo-DSPD-(1,2) auf eine Hill-Reaktion mit Nitrit im Vergleich mit der mit NADP untersucht (Tabelle 5 S.13). Obwohl im Nitrit-System die Stöchiometrie von O_2-Entwicklung und Nitritreduktion nicht gut ist und deshalb die Hemmung der Sauerstoffentwicklung nur größenordnungsmäßig mit der Nitritaufnahme übereinstimmt, zeigt der Versuch deutlich, daß auch die Hill-Reaktion mit Nitrit in isolierten Chloroplasten durch Sulfo-DSPD-(1,2) stark gehemmt wird.

Die Hemmung der photosynthetischen NADP-Reduktion durch Sulfo-DSPD-(1,2) ist von der Ferredoxin-Konzentration abhängig. Eine Erhöhung der Ferredoxin-Konzentration hebt die Hemmung teilweise wieder auf, denn sie sinkt von 71% bei 0,3 mg

Ferredoxin auf 45% bei 1,2 mg Ferredoxin (Tabelle 6 S.14). Bei der Messung der in der Kontrolle stöchiometrischen Menge an O_2, NADP und ATP zeigt es sich, daß die Hemmung der ATP-Bildung geringer ist als die der O_2-Entwicklung und der NADPH-Bildung (Tabelle 7 S.14). Dadurch steigt das Verhältnis ATP/NADPH von etwa 1 in der Kontrolle auf 1,9 bei Zugabe des Hemmstoffs. Gibt man Ferredoxin hinzu, das die Hemmung aller 3 Meßwerte teilweise aufhebt, steigt das Verhältnis sogar auf 2,2 (Tabelle 6 S.14). Die gleiche Erhöhung des Verhältnisses von ATP/NADPH ergibt sich auch, wenn durch schrittweise Erhöhung der Konzentration an Sulfo-DSPD-(1,3) die Hemmung der Gesamtreaktion vergrößert wird (Tabelle 8 S.15). Sulfo-DSPD-(1,3) ist weder allein, noch zusammen mit Ferredoxin oder NADP, Cofaktor einer Phosphorylierung in N_2 (Tabelle 9 S.15). In Luft wird dagegen etwas ATP gebildet. Vorbelichtung von Sulfo-DSPD-(1,3) mit Chloroplasten vermindert nicht die Hemmwirkung. Tetrahydro-sulfo-DSPD-(1,3) ist kein Hemmstoff der photosynthetischen NADP-Reduktion (Tabelle 9 S.15).
Den Einfluß der Kettenlänge eines Sulfodisalicylidendiamins auf die Hemmung der NADP-Reduktion zeigt Tabelle 10 S.16. Danach ist es für das Chloroplastensystem nicht sehr entscheidend, wie lang das Diamin ist.

Reaktionen mit intakten Chlorellazellen

Tabelle 12 S.17 zeigt, daß die photosynthetische O_2-Entwicklung in Chlorella durch 10^{-3} m DSPD-(1,3) zu 46% und durch $2 \cdot 10^{-3}$ m DSPD-(1,3) zu 84% gehemmt wird. Wesentlich empfindlicher als die CO_2-Assimilation ist die lichtabhängige Glucoseaufnahme unter N_2, die nach Kandler[16] ein Maß für die cyclische Photophosphorylierung in vivo ist. Vor allem die Glucoseaufnahme in Anwesenheit von 10^{-5} m DCMU (welches die O_2-Entwicklung vollständig unterbindet und somit eine cyclische Photophosphorylierung gewährleistet[16]) wird schon durch $5 \cdot 10^{-4}$ m DSPD-(1,3) zu 100% blockiert (Tabelle 12 S.17).

Die Hill-Reaktion mit p-Benzochinon in Chlorella wird, wie aus den Chloroplastenversuchen zu erwarten war, durch 10^{-3} m DSPD-(1,3) nur geringfügig beeinflußt (Tabelle 13 S.17). Die photosynthetische Nitratreduktion in Chlorella wird zu 86% gehemmt (Tabelle 13 S.17) in Übereinstimmung mit den Versuchen mit dem angereicherten Enzym (S.11 u.). Die Nitritreduktion, die im System mit isolierten Chloroplasten durch Sulfo-DSPD-(1,3) gehemmt wird, wird in Chlorella durch 10^{-3} m DSPD-(1,3) jedoch nicht gehemmt, sondern sogar geringfügig stimuliert (Tabelle 13 S.17).

Den Einfluß der Kettenlänge des Diamins in der Disalicylidenverbindung auf die Hemmung der Glucoseaufnahme in Chlorella zeigt Abb.3 S.18. Im Gegensatz zum Chloroplastensystem sinkt die Aktivität des Hemmstoffs mit der Zahl der C-Atome in der Diaminkomponente.

Reaktionen mit angereicherter Nitrit- und Nitrat-Reduktase

Nach Losada[15] kann die Reduktion von Nitrit durch die Nitritreduktase im Dunkeln verfolgt werden, wenn als Reduktant Natriumdithionit verwendet wird. Dabei ist der Zusatz von Methylviologen oder Ferredoxin als Cofaktoren erforderlich. Tabelle 11 S.16 zeigt, daß im Gegensatz zur ferredoxin-abhängigen photosynthetischen Nitritreduktion mit Chloroplasten (vgl. Tabelle 5 S.13) die Nitritreduktion im Dunkeln mit Methylviologen oder Ferredoxin als Cofaktoren durch 10^{-3} m Sulfo-DSPD-(1,3) nicht gehemmt wird; im Gegenteil, Sulfo-DSPD-(1,3) kann sogar selbst als Cofaktor einer Nitritreduktion dienen.
Dagegen wird die Reduktion von Nitrat durch die Nitratreduktase mit Methylviologen als Cofaktor und Dithionit als Reduktant schon durch $3 \cdot 10^{-4}$ m zu 43% und durch $7 \cdot 10^{-4}$ m Sulfo-DSPD-(1,3) zu 100% gehemmt (Abb.4 S.18).

Tabelle 2: Einfluß von 10^{-3} m Sulfo-DSPD-(1,2) auf die Hill-Reaktion mit K-Ferricyanid und auf die cyclische Photophosphorylierung in isolierten Chloroplasten (15 Min. Licht unter N_2).

	µAtome O entwickelt	µMol ATP gebildet
20 µMole K-Ferricyanid	5,1	5,1
+ 10^{-3} m Sulfo-DSPD-(1,3)	5,1	5,5
+ $2 \cdot 10^{-3}$ m "	6,0	5,3
0,3 µMole Menadion		6,2
+ 10^{-3} m Sulfo-DSPD-(1,2)		6,4
+ $2 \cdot 10^{-3}$ m "		6,2
0,3 µMole PMS		6,0
+ 10^{-3} m Sulfo-DSPD-(1,2)		6,6
+ $2 \cdot 10^{-3}$ m "		5,2

Tabelle 3: Einfluß von Sulfo-DSPD-(1,2) auf die pseudocyclische Photophosphorylierung mit Anthrachinonsulfonsäure und auf die chinon-stimulierte (mit FMN und mit Menadion) Ascorbat-Photooxydation in isolierten Chloroplasten (15 Min. Licht in Luft, 10^{-3} m KCN im Gefäß)

	µAtome O aufgenommen	µMol H_2O_2 gebildet	µMol ATP gebildet
0,1 µMole Anthrachinon-p-sulfonsäure	4,9		4,5
+ $2 \cdot 10^{-3}$ m Sulfo-DSPD-(1,2)	4,4		4,8
10 µMole Ascorbat + 0,05 µMole FMN	11,5	5,3	4,1
+ 10^{-3} m Sulfo-DSPD-(1,2)	11,3	4,9	4,3
10 µMole Ascorbat + 0,03 µMole Menadion	9,7		3,8
+ 10^{-3} m Sulfo-DSPD-(1,2)	10,0		3,9
+ $2 \cdot 10^{-3}$ m "	10,3		4,5

Tabelle 4: Hemmung der photosynthetischen NADP-Reduktion in isolierten Chloroplasten durch Sulfo-DSPD-(1,2)
(15 Min. Licht in N_2, 0,3 mg Ferredoxin und 10 uMole Ascorbat pro Gefäß).

	µAtome O entwickelt	µMole NADPH gebildet	Hemmung in %
- - -	3,9	4,6	
+ 10^{-3}m Sulfo-DSPD-(1,2)	0,9	0,8	83
+ $2 \cdot 10^{-3}$m "	0,4	0,4	91
+ $2 \cdot 10^{-3}$m " + 0,2 µMole DCPIP	0,6	0,4	91

Tabelle 5: Einfluß steigender Konzentrationen von Sulfo-DSPD-(1,2) auf die photosynthetische NADP- und Nitritreduktion durch isolierte Chloroplasten (in N_2 mit 0,3 mg Ferredoxin; 12 Min. Licht im NADP- und 60 Min. Licht im NO_2-System; die NADP-Versuche enthielten 10 µMole Ascorbat pro Gefäß, die Nitrit-Versuche angereicherte Nitritreduktase aus Spinat).

	NADP-Reduktion		Nitrit-Reduktion	
	µAtome O entwickelt	µMole NADPH gebildet	µAtome O entwickelt	µMole NO_2^- reduziert
- - -	4,4	4,7	7,6	3,4
+ $5 \cdot 10^{-4}$m Sulfo-DSPD-(1,2)	1,8(60%)	2,0(57%)	1,7(78%)	0,8(77%)
+ 10^{-3}m "	1,1(73%)	1,1(77%)	1,1(86%)	1,1(68%)
+ $2 \cdot 10^{-3}$m "	0,4(91%)	0,4(91%)	0,5(93%)	0,4(88%)

Tabelle 6: Aufhebung der DSPD-Hemmung der NADP-Reduktion in isolierten Chloroplasten durch Erhöhung der Ferredoxinkonzentration (15 Min. Licht in N_2).

Zusätze zu 6 uMole NADP + 10 µMole Ascorbat	uMole NADPH gebildet minus	plus 10^{-3} m Sulfo-DSPD-(1,2)	Hemmung (in %)
0,3 mg Ferredoxin	3,9	1,1	72
0,6 mg "	4,8	1,8	62
0,9 mg "	4,6	2,3	50
1,2 mg "	4,7	2,6	45

Tabelle 7: Erhöhung des Verhältnisses von gebildetem ATP/NADPH bei Hemmung der NADP-Reduktion in isolierten Chloroplasten durch Sulfo-DSPD und der teilweisen Aufhebung der Hemmung durch Ferredoxin (15 Min. Licht in N_2).

Zusätze zu 6 µMole NADP + 10 µMole Ascorbat	µAtome O entwickelt	µMole NADPH gebildet	µMole ATP gebildet	ATP/NADPH
0,3 mg Ferredoxin	4,1	4,4	4,3	0,9
0,3 mg Ferredoxin + 10^{-3}m Sulfo-DSPD-(1,2)	0,8	1,1	2,1	1,9
1,2 mg Ferredoxin + 10^{-3}m Sulfo-DSPD-(1,2)	1,9	2,2	4,8	2,2

Tabelle 8: Erhöhung des Verhältnisses von ATP/NADPH bei Vergrößerung der Hemmung der Hill-Reaktion mit NADP in isolierten Chloroplasten und Sulfo-DSPD-(1,2) (15 Min. Licht in N_2).

	µAtome entwickelt	µMole NADPH gebildet	µMole ATP gebildet	ATP/ NADPH
6 µMole NADP + 0,3 mg Ferredoxin	4,7	4,9	4,9	1,0
+ $3 \cdot 10^{-4}$m Sulfo-DSPD-(1,2)	3,4	3,6	4,3	1,2
+ $5 \cdot 10^{-4}$m "	2,6	2,9	3,5	1,2
+ $7 \cdot 10^{-4}$m "	1,7	2,1	3,1	1,5
+ 10^{-3}m "	1,3	1,7	2,7	1,6
+ $2 \cdot 10^{-3}$m	1,0	0,7	1,7	2,4

Tabelle 9: Sulfo-DSPD-(1,3) als möglicher Cofaktor einer Phosphorylierung und sein Einfluß auf die NADP-Reduktion nach Vorbelichtung im Vergleich mit Tetrahydro-sulfo-DSPD-(1,3) in isolierten Chloroplasten (15 Min. Licht).

	µMole ATP gebildet	µMole NADPH gebildet
10^{-3}m Sulfo-DSPD-(1,3) in Luft	0,8	
in N_2	0,03	
+ 1,2 mg Ferredoxin in N_2	0,1	
+ 1,2 mg + 0,3 µMole NADP in N_2	0,1	
6 µMole NADP, 0,3 mg Ferredoxin in N_2	4,1	4,2
+ 10^{-3}m Sulfo-DSPD-(1,3) in N_2	2,0	0,8
+ 10^{-3}m (5 Min.Vorbel.)in N_2	1,9	0,8
6 µMole NADP, 0,3 mg Ferredoxin + 10^{-3} Tetrahydro-sulfo-DSPD-(1,3) in N_2	4,3	3,9

Tabelle 10: Hemmung der NADP-Reduktion in isolierten Chloroplasten durch 10^{-3}m Sulfo-salicylidendiamin in Abhängigkeit von der Kettenlänge der Diaminkomponente (15 Min. Licht in N_2 und 0,3 mg Ferredoxin)

Diaminkomponente in der Sulfo-disalicylidenverbindung	Zahl der C-Atome im Diamin	µAtome O entwickelt	µMole NADPH gebildet
Kontrolle ohne Hemmstoff		3,9	3,8
Äthylendiamin	2	1,4	1,6
1,3-Diamino-propan	3	0,5	0,5
1,4-Diamino-butan	4	0,5	0,3
1,6-Diamino-hexan	6	0,7	0,5
1,8-Diamino-octan	8	1,1	0,8
1,3-Diamino-propan (ohne Sulfogruppen an den Ringen!)	3	2,1	2,0

Tabelle 11: Einfluß von Sulfo-DSPD-(1,3) auf die Nitritreduktion durch Dithionit mit Methylviologen oder Ferredoxin als Cofaktoren und angereicherter Nitritreduktase (Versuchsdauer 15 Min.)

Cofaktor	µMole NO_2^- reduz.
- - -	0
+ 0,2 µMol Methylviologen	0,91
+ 0,2 µMol Methylviologen + 10^{-3}m Sulfo-DSPD-(1,3)	0,96
+ 0,6 mg Ferredoxin	0,84
+ 0,6 mg Ferredoxin + 10^{-3}m Sulfo-DSPD-(1,3)	0,93
+ 0,2 µMol FMN	0
+ $5 \cdot 10^{-4}$m Sulfo-DSPD-(1,3)	0,79

Tabelle 12: Hemmung der CO_2-Fixierung und der Glucose-Aufnahme in Chlorella pyrenoidosa durch DSPD-(1,3).

	25 Min. Photosynthese in 5% CO_2/Luft		Glucose-Aufnahme nach ohne DCMU		45 Min. Licht in N_2 + 10^{-5}m DCMU	
	µMole O_2 entwickelt	Hemmung (in %)	µMole Glucose aufgenommen	Hemmung (in %)	µMole Glucose aufgenommen	Hemmung (in %)
Kontrolle	12,1		8,75		5,75	
+ $5 \cdot 10^{-4}$m DSPD-(1,3)	8,0	34	1,85	79	0	100
+ 10^{-3}m	6,5	46	0,35	96	0	100
+ $2 \cdot 10^{-3}$m	1,9	84	0,35	96	0	100
+ 10^{-5}m DCMU	0	100				

Tabelle 13: Einfluß von DSPD-(1,3) auf Nitrat- und Nitrit-Reduktion in Chlorella pyrenoidosa (20 Min. Licht in den Nitrit-, 60 Min. in den beiden anderen Versuchen unter N_2; in den Gefäßen befanden sich 8 µMol KNO_2 bzw. 6 µMol KNO_3 bzw. 1 µMol p-Benzochinon + 20 µMol K-Ferricyanid).

	µMole O_2 entwickelt		
	Nitrit-Reduktion	Nitrat-Reduktion	p-Benzochinon-Reduktion
Kontrolle	4,9	4,2	6,1
+ 10^{-3}m DSPD-(1,3)	6,0	0,6	4,8
Änderung gegenüber der Kontrolle	+ 18%	- 86%	- 21%

Tabelle 14: Hemmung der Atmung in Chlorella-Zellen durch DSPD-(1,3)

	O_2-Aufnahme in mm^3 mit Hemmstoff				
	ohne	10^{-3}m	% Hemmung	$5 \cdot 10^{-4}$	% Hemmu
- - -	32	16	50	19	41
+ 8 µMol Glucose	90	14	84	25	72
(Glucose bestimmt - µMol	8	1,5	81	2,0	75
+ 25 µMol Acetat	61	11	82	24	61
+ 15 µMol Succinat	37	11	70	-	-

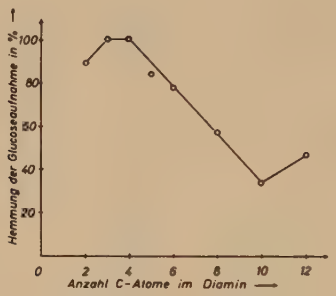


Abb.3: Hemmung der Glukoseaufnahme in Chlorella pyrenoidosa durch Disalicylidendiamine verschiedener Kettenlänge.

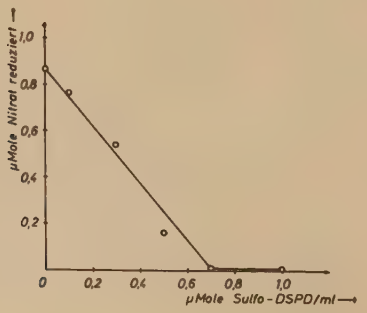


Abb.4: Hemmung der Nitratreduktion mit angereichertem Enzym aus Chlorella pyrenoidosa durch Sulfo-DSPD-(1,3).

Diskussion

Da Disalicylidendiamine wirkungsvolle Kupferkomplexbildner sind[11], war zu erwarten, daß sie wie der Cu-chelatbildner Salicylaldoxim Hemmstoffe des photosynthetischen Elektronentransportes sind. Sie sollten eine bessere Hemmung der Photosynthese bewirken und dadurch eine eindeutigere Charakterisierung der Hemmstelle im Elektronentransport zulassen als beim Salicylaldoxim, von dem eine sehr hohe Konzentration (von 10^{-2} m) angewendet werden muß, um Hill-Reaktion und cyclische Photophosphorylierung zu hemmen[17]. Tatsächlich hemmen die Disalicyliden-Verbindungen die Hill-Reaktion mit NADP in isolierten Chloroplasten und photosynthetische Reaktionen intakter Chlorellazellen bereits bei einer Konzentration von 10^{-3} m. Aus den S. 9 f berichteten Ergebnissen mit isolierten Chloroplasten ergibt sich aber eindeutig, daß die Hemmwirkung der Disalicylidenverbindungen nicht auf ihrer Eigenschaft als Kupferkomplexbildner beruht und sie keine Hemmstoffe des Plastocyanins sind. Auch beim Salicylaldoxim ist es deshalb sehr wahrscheinlich, daß seine Hemmwirkung des photosynthetischen Elektronentransportes nichts mit seiner Eigenschaft als Komplexbildner und sicher nichts mit dem Plastocyanin zu tun hat (vgl. dazu die kürzlich erschienene Arbeit von Katoh und San Pietro[18]).
Da es sich herausstellte, daß die Kettenlänge des Diamins für die Hemmwirkung der Chloroplastenphotosynthese von geringer Bedeutung ist, wurden als charakteristische Vertreter dieser Verbindungsklasse Sulfo-DSPD-(1,2) und -(1,3) eingesetzt.

Die Lokalisation der Hemmstelle zwischen dem Pigmentsystem I und dem Ferredoxin ergibt sich aus den folgenden Ergebnissen:

1. Sulfo-DSPD hemmt die Photoreduktion von NADP, sowohl die mit O_2-Entwicklung als auch die mit einem künstlichen Elektronendonatorsystem.

2. Sulfo-DSPD hemmt nicht: a) die Hill-Reaktion mit K-Ferricyanid, b) die cyclische Photophosphorylierung mit PMS oder Menadion als Cofaktoren, c) die pseudocyclische Photophosphorylierung mit Anthrachinon als Cofaktor und

d) die chinonstimulierte Ascorbat-Photooxydation.

3. Sulfo-DSPD hemmt die photosynthetische Nitrit-Reduktion, die nach Losada[15] Ferredoxin, aber nicht die Ferredoxin-NADP-Reduktase benötigt.

4. Die Nitrit-Reduktion im Dunkeln[15] mit Ferredoxin als Cofaktor und Dithionit als Reduktionsmittel wird nicht durch Sulfo-DSPD gehemmt.

Sulfo-DSPD ist also ein Hemmstoff, der die photosynthetische Reduktion des Ferredoxins verhindert, denn er hemmt nur die ferredoxinabhängige Photoreduktion von DADP und Nitrit. Es ist aber kein Hemmstoff des Ferredoxins selbst, da er die ebenfalls ferredoxinabhängige Nitritreduktion im Dunkeln mit Dithionit nicht hemmt. Sulfo-DSPD verhält sich damit analog einem Antikörper gegen die photosynthetische Ferredoxin-Reduktion, der, wie kürzlich beschrieben[19], durch Immunisierung von Kaninchen gegen Chloroplasten hergestellt werden konnte.

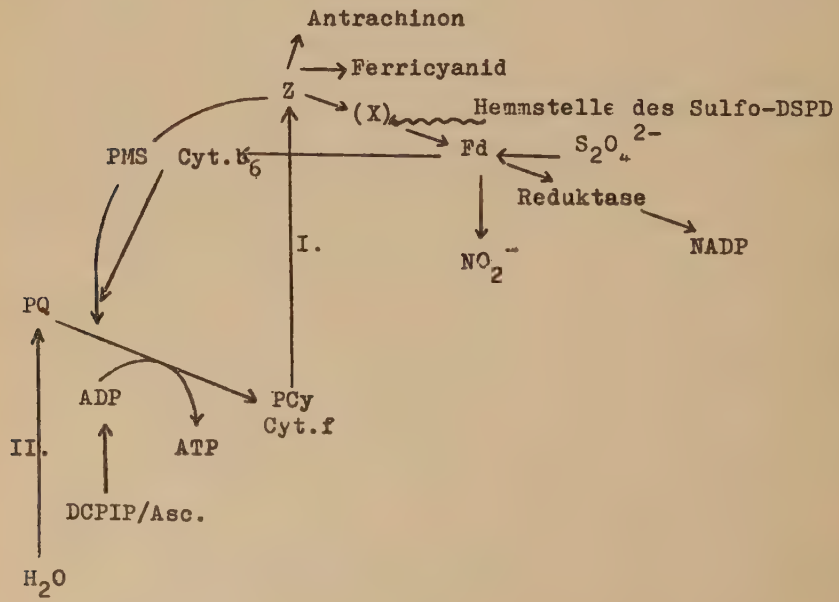


Abb.5: Lokalisation der Hemmstelle des Sulfo-DSPD innerhalb der Elektronentransportkette der Photosynthese

Zur Erklärung der Hemmwirkung gibt es zwei Möglichkeiten:

1. Eine hypothetische Substanz X, Cofaktor oder Enzym, ist in der Elektronentransportkette zwischen dem Pigmentsystem I und dem Ferredoxin lokalisiert und vermittelt spezifisch die photosynthetische Reduktion von Ferredoxin. Sie ist nicht an der Hill-Reaktion mit Ferricyanid oder Chinon und der cyclischen Photophosphorylierung mit PMS als Cofaktor beteiligt. Sulfo-DSPD und Ferredoxin konkurrieren um diese hypothetische Substanz X, so daß bei gegebener Ferredoxin-Konzentration die Rate der NADP-Reduktion fällt; Erhöhung der Ferredoxin-Konzentration kann die Hemmung der NADP-Reduktion durch Sulfo-DSPD teilweise wieder aufheben, wie gefunden.

2. Sulfo-DSPD wird zunächst wie alle anderen Hill-Reagenzien als Elektronenakzeptor an Z reduziert, das reduzierte Sulfo-DSPD reagiert, jetzt als Elektronendonator, aber wieder mit der Kette nach der ATP-Bildungsstelle zurück (etwa durch Reaktion mit dem oxydierten Pigmentsystem I), es schließt also die Elektronentransportkette kurz.

Die Hemmwirkung von Sulfo-DSPD beruht wahrscheinlich nicht auf seiner Kupferkomplexbildungs-Eigenschaft. Die Verbindung wird offenbar reduziert (Reduktion der Doppelbindung der Schiff'schen Base), entweder an oder durch X (X wird dabei blockiert) oder durch Z. Dabei dürfte allerdings nicht die Tetrahydro-Verbindung entstehen, denn das N,N'-Tetrahydro-disalicyliden-1,3-diamino-propan (XII) ist kein Hemmstoff der NADP-Reduktion. Vorbelichtung von Sulfo-DSPD vermindert seine Hemmwirkung nicht. Eine Stütze der Hypothese, daß Sulfo-DSPD photosynthetisch reduziert werden kann, ist, daß Sulfo-DSPD ein Cofaktor der Nitritreduktion in der durch Nitritreduktase katalysierten Reduktion von Nitrit mit Dithionit ist. Auch die Erhöhung des Verhältnisses von gebildetem ATP zu gebildetem NADPH in der offenkettigen Phosphorylierung bei der Hemmung der photosynthetischen NADP-Reduktion in isolierten

Chloroplasten durch Sulfo-DSPD könnte in der gleichen Richtung gedeutet werden.

Sulfo-DSPD ist weiterhin ein Hemmstoff der Nitratreduktase. Diese Eigenschaft geht offenbar auf die Metallkomplexbildungseigenschaften von Sulfo-DSPD zurück. Losada hat bereits darauf hingewiesen[20], daß die Nitratreduktase im Gegensatz zur Nitritreduktase gegen Azid und KCN empfindlich ist.

Wie an anderer Stelle berichtet wird, ist Sulfo-DSPD kein Hemmstoff der photosynthetischen NAD-Reduktion in isolierten Chromatophoren aus Rhodospirillum rubrum[21].

Wenn in den Disalicylidenverbindungen nach den Versuchen mit isolierten Chloroplasten ein Hemmstoff der photosynthetischen Ferredoxin-Reduktion vorliegt, sollte die Beeinflussung von photosynthetischen Reaktionen von intakten Chlorellazellen durch DSPD Rückschlüsse auf die Beteiligung von Ferredoxin in vivo erlauben. Erwartungsgemäß wurde die photosynthetische CO_2-Assimilation durch Chlorella pyrenoidosa durch DSPD gehemmt. Wesentlich empfindlicher ist jedoch die lichtabhängige Glucoseaufnahme unter N_2 durch Chlorella, die nach Kandler[16] eine einfache Methode zur Messung der cyclischen Photophosphorylierung in vivo ist. Auch aus der Antimycin-Empfindlichkeit und der cyclischen Photophosphorylierung in vivo wurde bereits gefolgert, daß der Cofaktor Ferredoxin sein könnte[16,22]; denn die einzige antimycin-empfindliche Reaktion isolierter Chloroplasten ist die ferredoxin-katalysierte cyclische Photophosphorylierung[23].
Die höhere Empfindlichkeit der cyclischen Photophosphorylierung für DSPD, verglichen mit der photosynthetischen O_2-Entwicklung in Chlorella, könnte sich dadurch erklären, daß die ferredoxin-abhängige cyclische Photophosphorylierung höhere Konzentrationen Ferredoxin zur Sättigung benötigt als die NADP-Reduktion[23]. Es ist auch bei anderen Hemmstoffen, wie Antimycin und Salicylaldoxim gefunden worden, daß sie die Glucose-Aufnahme durch Chlorella stärker beeinflussen als die CO_2-Assimilation[22].

Während die hohe Hemmung der photosynthetischen Nitratreduktion in vivo durch DSPD auf eine direkte Hemmung der Nitratreduktase zurückzuführen ist, ist es sehr überraschend, daß die Nitritreduktion in vivo durch Chlorella selbst durch 10^{-3} m DSPD nicht gehemmt wird; denn nach Losada[15] ist der Cofaktor der Nitritreduktion in vitro Ferredoxin, und die photosynthetische Nitritreduktion durch isolierte Chloroplasten wird durch DSPD gehemmt (die Nitritreduktion mit Dithionit im Enzymversuch wird nicht durch DSPD gehemmt). Man könnte daraus schließen, daß Ferredoxin nicht der physiologische Cofaktor der Nitritreduktion ist. Die unterschiedliche Empfindlichkeit von Nitrat- und Nitritreduktion in vivo gegenüber DSPD könnte für physiologische Untersuchungen von Interesse sein.

Beschreibung der Versuche

N,N'-Disalicylidenverbindungen (I-XI):

0,01 Mol Diaminkomponente wurden mit 0,02 Mol Salicylaldehyd in 15 ml absolutem Äthanol 15 Min. unter Rückfluß gekocht. Die Kondensationsprodukte kristallisieren in der Kälte aus. Sie werden entweder aus Essigester, Alkohol oder Wasser umkristallisiert. Die Ausbeuten liegen zwischen 50 und 80% d.Th. Folgende Verbindungen wurden auf diese Weise dargestellt:

N,N'-Disalicyliden-1,2-diamino-äthan (I):

Gelbe Blättchen, Schmp. 125°

NMR-Spektrum: δ (ppm) 3,9 (4) - 6,6 bis 7,5 (8) - 8,3 (2) - 13,1 (2) in $CDCl_3$

N,N'-Disalicyliden-1,3-diamino-propan (II):

Gelbe Nadeln, Schmp. 54°

IR-Spektrum: δ (cm^{-1}) 732-751-1148-1206-1277-1411-1458-1495-1579-1630-2840-2920-3000-3050 in KBr

N,N'-Disalicyliden-1,4-diamino-butan (III):

Gelbe Tafeln, Schmp. 91°

NMR-Spektrum: δ (ppm) 1,7 (4) - 3,6 (4) - 6,6 bis 7,6 (8) - 8,3 (2) - 13,3 (2) in $CDCl_3$

N,N'-Disalicyliden-1,5-diamino-pentan (IV):

Gelbe Tafeln, Schmp. 61°

NMR-Spektrum: δ (ppm) 1,5 (6) - 3,5 (4) - 6,6 bis 7,5 (8) - 8,3 (2) - 13,5 (2) in $CDCl_3$

N,N'-Disalicyliden-1,6-diamino-hexan (V):

Gelbe Nadeln, Schmp. 70°

$C_{20}H_{24}O_2N_2$ (324,4) Ber.: C 74,04 H 7,45 N 8,63
Gef.: C 73,99 H 7,57 N 8,64

NMR-Spektrum: δ (ppm) 1,5 (8) - 3,5 (4) - 6,6 bis 7,5 (8) - 8,3 (2) - 13,5 (2) in $CDCl_3$

N,N'-Disalicyliden-1,8-diamino-octen (VI):

Gelbe Nadeln, Schmp. 77°

NMR-Spektrum: δ (ppm) 1,3 (12) - 3,5 (4) - 6,6 bis 7,5 (8) - 8,3 (2) - 13,6 (2) in $CDCl_3$

N,N'-Disalicyliden-1,10-diamino-decan (VII):

Gelbe Tafeln, Schmp. 66°

NMR-Spektrum: δ (ppm) 1,3 (16) - 3,5 (4) - 6,6 bis 7,5 (8) - 8,3 (2) - 13,6 (2) in $CDCl_3$

N,N'-Disalicyliden-1,12-diamino-dodecan (VIII):

Gelbe Nadeln, Schmp. 75°

NMR-Spektrum: δ (ppm) 1,3 (20) - 3,5 (4) - 6,6 bis 7,5 (8) - 8,2 (2) - 13,6 (2) in $CDCl_3$

N,N'-Disalicyliden-o-phenylendiazin (IX):

Orangefarbene Stäbchen, Schmp. 165°

NMR-Spektrum: δ (ppm) 6,6 bis 7,6 (12) - 8,6 (2) - 13,0 (2) in $CDCl_3$

N,N-Disalicyliden-p-phenylendiamin (X):

Orangefarbene Stäbchen, Schmp. 212°

NMR-Spektrum: δ (ppm) 6,7 bis 7,6 (12) - 8,7 (2) - 13,2 (2) in $CDCl_3$

N,N-Disalicyliden-tetramethyl-p-phenylendiamin (XI):

Gelbe Tafeln, sublimieren oberhalb 200°

NMR-Spektrum: δ (ppm) 2,1 (12) - 6,7 bis 7,6 (8) - 8,3 (2) - 13,1 (2) in $CDCl_3$

N,N'-Tetrahydro-disalicyliden-1,3-diamino-propan (XII):

1 g N,N'-Disalicyliden-1,3-diamino-propan (II) wurde in 10 ml Methanol gelöst, mit 100 mg $Pd/BaSO_4$ (10% Pd) versetzt und hydriert. Die Wasserstoffaufnahme (185 cm^3 bei 22°) war nach 5 Stdn. beendet. Man zentrifugierte vom Katalysator ab. Nach kurzem Stehen in der Kälte kristallisierte die Tetrahydro-Verbindung aus. Sie wurde aus Methanol umkristallisiert.

Farblose Nadeln, Schmp. 110°

NMR-Spektrum: δ (ppm) 1,6 (2) - 2,6 (2) - 3,6 (4) - 6,3 bis 7,3 (8) in NaOD

N,N'-Disulfo-disalicylidenverbindungen (XIII-XVIII):

5 g 5-Sulfosalicylsäure wurden mit 2 g Soda neutralisiert und in 350 ml Wasser gegeben. Unter kräftigem Rühren wurden 6 g Anilin, 5 g Borsäure, 85 g Kochsalz und wenn sich alles gelöst hat, weitere 40 g Borsäure und schließlich in kleinen Portionen 130 g pulverisiertes Natriumamalgam (125 g Quecksilber + 5 g Natrium) hinzugefügt. Man rührte 2 Stdn. und filtrierte dann die gebildete gelbe Sulfo-hydroxy-benzyliden-Verbindung ab (5-7 g), wusch mit Petroläther (40-60°) und zersetzte den Rückstand mit ca. 2 g Soda durch Wasserdampfdestillation. Dabei ging Anilin über. Man filtrierte ab und kochte die Lösung zweimal mit Tierkohle, ließ erkalten und dekantierte von ev. auskristallisiertem Kochsalz ab. Dann säuerte man die Lösung mit konz. Salzsäure an und sättigte mit Kochsalz. Das Natriumsalz des 5-Sulfosalicylaldehyds kristallisierte nach mehrstündigem Stehen in der Kälte aus. Ausbeute 30% d.Th. Die Verbindung läßt sich aus absolutem Äthanol umkristallisieren. Sie ist wenig löslich in Dioxan, Benzol, Essigester und Aceton; löslich in Methanol und Wasser. 0,02 Mol des 5-Sulfosalicylaldehyds wurden in heißem absolutem Alkohol gelöst und tropfenweise mit 0,01 Mol der Diaminkomponente versetzt. Es fällt augenblicklich die Sulfosalicylidenverbindung, die man abfiltriert, mit kaltem Äthanol wäscht und trocknet. Ausbeute 10% d.Th. (berechnet auf die anfangs eingesetzte 5-Sulfosalicylsäure). Alle Verbindungen konnten nur amorph erhalten werden. Sie sind gelb gefärbt, wasserlöslich und geben mit Schwermetallionen farbige Komplexe.

N,N'-Disalicyliden-1,2-diaminoäthan-5,5'-disulfonsäure (XIII):
NMR-Spektrum: δ (ppm) 4,0 - 6,6 bis 8,1 - 8,4 in D_2O

N,N'-Disalicyliden-1,2-diaminopropan-5,5'-disulfonsäure (XIV):

N,N'-Disalicyliden-1,3-diaminopropan-5,5'-disulfonsäure (XV):
NMR-Spektrum: δ (ppm) 2,2 - 3,8 - 6,5 bis 8,1 - 8,4 in D_2O
IR-Spektrum: ν (cm^{-1}) 600-659-728-829-1044-1110-1200-1285-1480-1578-1610-1635-2860-2930-3450 in KBr

N,N'-Disalicyliden-1,8-diamino-octen (VI):

Gelbe Nadeln, Schmp. 77°

NMR-Spektrum: δ (ppm) 1,3 (12) - 3,5 (4) - 6,6 bis 7,5 (8) - 8,3 (2) - 13,6 (2) in $CDCl_3$

N,N'-Disalicyliden-1,10-diamino-decan (VII):

Gelbe Tafeln, Schmp. 66°

NMR-Spektrum: δ (ppm) 1,3 (16) - 3,5 (4) - 6,6 bis 7,5 (8) - 8,3 (2) - 13,6 (2) in $CDCl_3$

N,N'-Disalicyliden-1,12-diamino-dodecan (VIII):

Gelbe Nadeln, Schmp. 75°

NMR-Spektrum: δ (ppm) 1,3 (20) - 3,5 (4) - 6,6 bis 7,5 (8) - 8,2 (2) - 13,6 (2) in $CDCl_3$

N,N'-Disalicyliden-o-phenylendiazin (IX):

Orangefarbene Stäbchen, Schmp. 165°

NMR-Spektrum: δ (ppm) 6,6 bis 7,6 (12) - 8,6 (2) - 13,0 (2) in $CDCl_3$

N,N-Disalicyliden-p-phenylendiamin (X):

Orangefarbene Stäbchen, Schmp. 212°

NMR-Spektrum: δ (ppm) 6,7 bis 7,6 (12) - 8,7 (2) - 13,2 (2) in $CDCl_3$

N,N-Disalicyliden-tetramethyl-p-phenylendiamin (XI):

Gelbe Tafeln, sublimieren oberhalb 200°

NMR-Spektrum: δ (ppm) 2,1 (12) - 6,7 bis 7,6 (8) - 8,3 (2) - 13,1 (2) in $CDCl_3$

N,N'-Tetrahydro-disalicyliden-1,3-diamino-propan (XII):

1 g N,N'-Disalicyliden-1,3-diamino-propan (II) wurde in 10 ml Methanol gelöst, mit 100 mg $Pd/BaSO_4$ (10% Pd) versetzt und hydriert. Die Wasserstoffaufnahme (185 cm^3 bei 22°) war nach 5 Stdn. beendet. Man zentrifugierte vom Katalysator ab. Nach kurzem Stehen in der Kälte kristallisierte die Tetrahydro-Verbindung aus. Sie wurde aus Methanol umkristallisiert. Farblose Nadeln, Schmp. 110°

NMR-Spektrum: δ (ppm) 1,6 (2) - 2,6 (2) - 3,6 (4) - 6,3 bis 7,3 (8) in NaOD

N,N'-Disulfo-disalicylidenverbindungen (XIII-XVIII):

5 g 5-Sulfosalicylsäure wurden mit 2 g Soda neutralisiert und in 350 ml Wasser gegeben. Unter kräftigem Rühren wurden 6 g Anilin, 5 g Borsäure, 85 g Kochsalz und wenn sich alles gelöst hat, weitere 40 g Borsäure und schließlich in kleinen Portionen 130 g pulverisiertes Natriumamalgam (125 g Quecksilber + 5 g Natrium) hinzugefügt. Man rührte 2 Stdn. und filtrierte dann die gebildete gelbe Sulfo-hydroxy-benzyliden-Verbindung ab (5-7 g), wusch mit Petroläther (40-60°) und zersetzte den Rückstand mit ca. 2 g Soda durch Wasserdampfdestillation. Dabei ging Anilin über. Man filtrierte ab und kochte die Lösung zweimal mit Tierkohle, ließ erkalten und dekantierte von ev. auskristallisiertem Kochsalz ab. Dann säuerte man die Lösung mit konz. Salzsäure an und sättigte mit Kochsalz. Das Natriumsalz des 5-Sulfosalicylaldehyds kristallisierte nach mehrstündigem Stehen in der Kälte aus. Ausbeute 30% d.Th. Die Verbindung läßt sich aus absolutem Äthanol umkristallisieren. Sie ist wenig löslich in Dioxan, Benzol, Essigester und Aceton; löslich in Methanol und Wasser. 0,02 Mol des 5-Sulfosalicylaldehyds wurden in heißem absolutem Alkohol gelöst und tropfenweise mit 0,01 Mol der Diaminkomponente versetzt. Es fällt augenblicklich die Sulfosalicylidenverbindung, die man abfiltriert, mit kaltem Äthanol wäscht und trocknet. Ausbeute 10% d.Th. (berechnet auf die anfangs eingesetzte 5-Sulfosalicylsäure). Alle Verbindungen konnten nur amorph erhalten werden. Sie sind gelb gefärbt, wasserlöslich und geben mit Schwermetallionen farbige Komplexe.

N,N'-Disalicyliden-1,2-diaminoäthan-5,5'-disulfonsäure (XIII):
NMR-Spektrum: δ (ppm) 4,0 - 6,6 bis 8,1 - 8,4 in D_2O

N,N'-Disalicyliden-1,2-diaminopropan-5,5'-disulfonsäure (XIV):

N,N'-Disalicyliden-1,3-diaminopropan-5,5'-disulfonsäure (XV):
NMR-Spektrum: δ (ppm) 2,2 - 3,8 - 6,5 bis 8,1 - 8,4 in D_2O
IR-Spektrum: ν (cm^{-1}) 600-659-728-829-1044-1110-1200-1285-1480-1578-1610-1635-2860-2930-3450 in KBr

$C_{17}H_{16}O_8N_2S_2Na_2$ 1 1/2 H_2O (513,5) Ber.: C 39,76 H 3,70
Gef.: C 39,15 H 3,71

Beim Trocknen im Hochvakuum verlor die Substanz 1 1/2 Mol Wasser

N,N'-Disalicyliden-1,4-diaminobutan-5,5'-disulfonsäure (XVI):
NMR-Spektrum: δ (ppm) 3,2 - 4,2 - 5,6 bis 6,7 - 7,4 in D_2O

N,N'-Disalicyliden-1,6-diaminohexan-5,5'-disulfonsäure (XVII):
NMR-Spektrum: δ (ppm) 3,0 - 4,1 - 5,6 bis 6,6 - 7,4 in D_2O

N,N'-Disalicyliden-1,8-diaminooctan-5,5'-disulfonsäure (XVIII):
NMR-Spektrum: δ (ppm) 2,9 - 4,1 - 5,6 bis 6,6 - 7,4 in D_2O

Herstellung von Chloroplasten

Die Versuche wurden mit "broken chloroplasts" von Spinat durchgeführt. Sie wurden nach Arnon[1] durch Zerreiben von Spinatblättern in 0,35 m Natriumchlorid + 10% 0,2 m Trispuffer pH 8 und Differential-Zentrifugation gewonnen. Die so erhaltenen ganzen Chloroplasten wurden in Wasser osmotisch aufgebrochen und die Chloroplastenfragmente hochtourig vom wäßrigen Chloroplastenextrakt abzentrifugiert. Die Reaktion wurde in konischen Warburg-Gefäßen von etwa 14 ml Inhalt bei 15° durchgeführt. Jedes Gefäß enthielt in einem Gesamtvolumen von 3 ml folgende Substanzen in µMol: Trispuffer pH 8 (80); $MgCl_2$ (5); ADP (10); anorganisches Phosphat (10); "broken chloroplasts" (P_{1s1}) mit einem Chlorophyllgehalt von 0,2 mg; K-Ferricyanid (20) bzw. Menadion oder Methylphenazoniummethosulfat (0,3) und die in den Tabellen angegebenen Alkyl-benzimidazole. Nachdem die Gefäße mit N_2 äquilibriert worden waren, wurde 15 Min. mit 35 000 Lux (Philips Attralux Lampen) belichtet. Die O_2-Entwicklung wurde manometrisch verfolgt. ATP wurde in einem Aliquot der nach 15 Min. Belichtung mit 0,2 ml 20 proz. Trichloressigsäurelösung gestoppten Proben enzymatisch mit Phosphoglycerinsäure, NADH, Triosephosphatdehydrogenase und Phosphoglyceratkinase durch den dem ATP proportionalen Abfall bei 340 mµ oder durch den Einbau von radioaktivem Phosphat

(10 µMol anorganisches Phosphat mit 90 000 ipm ^{32}P pro Gefäß) in organisches Phosphat bestimmt. Das überschüssige anorganische Phosphat wurde nach der Methode von Sugino und Miyoshi[24] gefällt.

Die Nitritreduktase wurde aus Spinat nach der Vorschrift von Losada[15] bis zum Schritt nach der 1. Chromatographie an DEAE-Cellulose angereichert.
Der Versuchsansatz zur Messung der Nitritreduktion im Dunkeln enthält: 0,01 m Trispuffer pH 7,5; 3 µMol Natriumnitrit; 0,2 ml einer Lösung von 250 mg Natriumdithionit + 244 mg Natriumhydrogen-carbonat in 10 ml H_2O; 0,1 ml Enzymlösung (39 mg Protein/ml) und die in den Tabellen angegebenen Zusätze in 3 ml. Nach 15 Min. Inkubation bei 30° wurde der Versuch durch intensives Einschütteln von Luft gestoppt und das verbliebene Nitrit durch Diazotierung mit Sulfanilsäure und Kopplung mit α-Naphthylamin nach Gries und Ilosvay[25] und Messung der Extinktion bei 530 mµ bestimmt.

Die Nitratreduktase wurde aus Chlorella pyrenoidosa gewonnen. Dazu wurden 1,2 l einer Kultursuspension von 2-3 Tage alten Chlorellazellen mit 7,2 mg Chlorophyll/200 ml abzentrifugiert, gewaschen, mit 20 ml 0,01 m Trispuffer pH 7,5 aufgenommen und im Homogenisator nach Mergenschlager 5 Min. unter Kühlung mit Glasperlen von 0,45-0,50 mm Durchmesser zerschlagen. Die Suspension wurde auf einer Glasfritte abgesaugt, bei 18 000 g zentrifugiert und mit Ammoniumsulfat fraktioniert. Die Fraktion von 10-50% Sättigung wurde in 20 ml 0,01 m Phosphatpuffer pH 7,5 aufgenommen und für die Teste verwendet.
Der Versuchsansatz zur Messung der Nitratreduktion enthielt in 3 ml 0,1 m Phosphatpuffer pH 7,0: 1 µMol Kaliumnitrat; 0,2 ml einer Natriumdithionitlösung (250 mg Natriumdithionit + 244 mg Natriumhydrogen-carbonat/10 ml H_2O); 0,3 ml Enzymlösung (190 Protein/ml) und die in den Tabellen angegebenen Zusätze. Nach 15 Min. bei 30° wurde der Ansatz zur vollständigen Oxydation des überschüssigen Dithionits kräftig mechanisch mit Luft geschüttelt. Dann wurde er mit 1 ml Gries-Ilosvay-Reagenz[25] versetzt, 5 Min. bei 5000 g zentrifugiert und nach 10 Min. die Extinktion bei 530 mµ bestimmt.

Photosyntheseversuche mit intakten Chlorellazellen

1 Tag alte Kulturen von Chlorella pyrenoidosa wurden abzentrifugiert und in 0,2 m Phosphatpuffer pH 7,0 aufgenommen. Für Photosyntheseversuche wurden 3 ml einer Algensuspension mit 0,2 mg Chlorophyll verwendet. Nach Begasung mit 5% CO_2/Luft wurde bei 25° mit 35 000 Lux belichtet und die O_2-Entwicklung manometrisch verfolgt.

Zur Messung der Glucoseaufnahme wurden 1,5 ml einer Algensuspension, die vor dem Abzentrifugieren 20 Stdn. im Dunkeln gehalten worden war, in insgesamt 3 ml 0,2 m Phosphatpuffer pH 7,0 und nach Zugabe von 10 µMol Glucose bei 25° unter N_2 inkubiert. Nach 45 Min. wurden die Algen abzentrifugiert und 1 ml des Überstandes mit 4 ml Anthron-Reagenz (100 mg Anthron und 1 g Thionarnstoff in 100 ml 75 proz. Schwefelsäure) 15 Min. bei 100° erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Extinktion bei 544 mµ bestimmt.

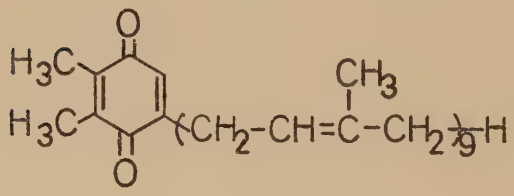
Zur Messung der photosynthetischen Nitrat- und Nitritreduktion bei Chlorella wurden 1 ml der Algensuspension mit 10 µMol Natriumnitrit bzw. 5 µMol Kaliumnitrat in insgesamt 3 ml 0,2 m Phosphatpuffer pH 7,0 unter N_2 mit KOH im Zentralgefäß mit 35 000 Lux belichtet und die O_2-Entwicklung manometrisch verfolgt.

Nach Beendigung der Inkubation wurden die Proben abzentrifugiert und nicht verbrauchtes Nitrit nach Gries und Ilosvay und Nitrat mit Pyrogallolsulfonsäure nach de Nardo[26] bestimmt.

Über die Isolierung und Eigenschaften einiger neuer p-Benzochinone aus Fliederblättern

Theoretischer Teil:

Nachdem seit den Arbeiten von Hatefi et al[27] die Bedeutung des Ubichinon-10 (2,3-Dimethoxy-6-methyl-5-decaprenyl-1,4-benzochinon) für die Respirationskette sichergestellt war, gewannen Chinone als Redoxkatalysatoren für Elektronentransportsysteme zunehmend an Bedeutung.
Bishop[6] und Krogmann und Olivero[28] wiesen 1962 die Beteiligung des schon 1946 von Kofler[3] entdeckten Plastochinon-9 (XIX) an der Photosynthese nach.



Plastochinon-9 (XIX)

Daraufhin richtete sich das Augenmerk verschiedener Arbeitsgruppen auf die Isolierung und Identifizierung weiterer in Chloroplasten vorkommender Benzochinone, um deren eventuelle Bedeutung für die Photosynthese aufzuklären.
Crane et al[7] entdeckten in Spinatchloroplasten eine Reihe weiterer Plastochinone, die sie als Plastochinone B, C und D bezeichneten.
Trebst und Eck[29] beschreiben die Isolierung von Plastochinon-4 und von Dimeren des Plastochinon-4 bzw. Plastochinon-9 aus Kastanienblättern.

Schließlich glauben Folkers et al[30] Plastochinon-3 in Spinat nachgewiesen zu haben.
Die folgende Tabelle 15 enthält einige von der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature*) vorgeschlagene abgekürzte Schreibweisen für isoprenoide Chinone, die im folgenden verwendet werden.

Tabelle 15: Kurzbezeichnungen für isoprenoide Chinone

Verbindungsklasse	Abkürzung
Plastochinone	PQ
z.B. Plastochinon-9	PQ-9
Ubichinone	Q
z.B. Ubichinon-10	Q-10
Tocopherylchinone	TQ
z.B. α-Tocopherrylchinon	α-TQ

Chloroplasten enthalten auch Naphthochinone.
Plastochinone (zumindest PQ-9) scheinen im Pflanzenreich weit verbreitet zu sein. Es ist bisher trotz umfangreicher Untersuchungen von Kofler[3], Egger[31] und Crane kein Beispiel einer grünen Pflanze bekannt, die kein Plastochinon enthielte. Die absoluten Mengenverhältnisse unterliegen allerdings beträchtlichen jahreszeitlich und artbedingten Schwankungen. So finden sich in den Sonnenblättern der Roßkastanie (Aesculus hippocastanum) im Juni 0,2 mg und im August 1,4 mg PQ-9/10 Blätter. Für Flieder (Syringa vulgaris) sind die entsprechenden Werte: Juni 0,9 mg, August 1,3 mg PQ-9/10 Blätter. Während des herbstlichen Pigmentabbaus fallen diese Werte dann wieder. Chromoplasten führen offenbar keine Chinonbiosynthese durch.
Es gibt bisher keine überzeugenden experimentellen Hinweise dafür, daß außer dem PQ-9 noch weitere p-Benzochinone am Elektronentransport der Photosynthese beteiligt sind. Die

*) Biochim. Biophys. Acta 107, 5 (1965)

Möglichkeit, daß es sich bei einigen der Nebenchinone lediglich um biosynthetische Vorstufen des PQ-9 ohne funktionelle Bedeutung oder gar Artefakte der Aufarbeitung handelt, ist nicht auszuschließen.

Der folgende Teil dieser Arbeit stellt den Versuch dar, die Benzochinone von Fliederchloroplasten durch gründliche Extraktion zu isolieren, um eventuell neue Verbindungen dieses Typs aufzufinden und zu identifizieren bzw. um bereits bekannte Verbindungen in dieser Spezies nachzuweisen.

Ergebnisse:

Aufarbeitung und Trennung von p-Benzochinonen aus Fliederblättern und Spinatchloroplasten

Der lipophile Charakter der Plastochinone läßt vermuten, daß nur mit unpolaren Lösungsmitteln eine erfolgreiche Extraktion der Chinone möglich erscheint. Entsprechende Versuche haben jedoch gezeigt, daß der Zusatz einer bestimmten Menge Wasser für die vollständige Extraktion erforderlich ist.
So ließ sich aus lyophilisierten Spinatchloroplasten mit Aceton nur das PQ-9 entfernen. Chinone des B- und C-Typs waren erst nach Zusatz von Wasser aus dem Rückstand mit Aceton extrahierbar.
Diese Beobachtung wird durch ähnliche Schwierigkeiten bei der Isolierung von Chinonen aus Luzerne bestätigt[32]. Zu den gleichen Ergebnissen kommen offenbar auch Lichthentaler und Calvin[33].
Aus getrockneten Tabak- und Kastanienblättern gelingt eine vollständige Extraktion hingegen auch mit Aceton bzw. Petroläther allein[34,29].
Crane[7] empfiehlt ein Zweiphasensystem aus Heptan und Wasser mit n-Propanol als Lösungsvermittler. Dieses System lieferte bei Vorversuchen die besten Ergebnisse, so daß es hier fast ausschließlich Verwendung fand. Die Extraktion nach dieser Methode lieferte einen Rohextrakt, der neben den Chinonen große Mengen Chlorophyll, Carotinoide, Lipoide und andere Verbindungen enthielt. Zur Auftrennung dieses Gemisches eignete sich die Säulenchromatographie mit Kieselgel H (Merck) als Trägermaterial am besten. Eluiert wurde mit niedrigsiedendem Petroläther (40-60°), der steigende Mengen peroxidfreien Äther enthielt. Man gewinnt so verschiedene Chinonfraktionen (ab ca. 12% Äther), die an präparativen Kieselgel G-Schichten weiter aufgetrennt werden können.
Papierchromatographische Trennungen dienten daneben nur zur qualitativen Beurteilung der Extraktionsergebnisse.

Chemische und physikalische Eigenschaften der aus Flieder und Spinat isolierten Chinone im Vergleich mit Modellsubstanzen

Dünnschichtchromatographie

Zur Auftrennung der im vorangegangenen Teil beschriebenen Chinonfraktionen diente die Dünnschichtchromatographie auf präparativen Kieselgel G-Schichten.
Dazu wurden die in Tabelle 16 zusammengestellten Lösungsmittelsysteme ausgearbeitet.

Tabelle 16: Lösungsmittelsysteme zur Trennung von p-Benzochinonen auf präparativen Dünnschichtplatten

Steigmittel	Anwendung
1a) Benzol/Petroläther(1:1)	System I: Vortrennnung des Rohextraktes
b) Benzol	
2) Chloroform	System II: Nachtrennung
3) Aceton/Wasser(95:5)	System III: Reinheitsprüfung
4) Paraffingesättigtes 96 proz. Äthanol	Kettenlängenbestimmung
5) Benzol	Trennung synthetischer p-Benzochinone
6) Benzol/Petroläther(1:1)	wie unter 2), jedoch 1-3 mal entwickeln
7) Petroläther/$CHCl_3$(1:1)	wie unter 2)
8) Petroläther/Äther(7:1)	wie unter 2)

Für die Systeme 3) und 4) wurden 250 µ Schichten verwendet, die mit Paraffinöl (5 proz.) in Petroläther (40-60°) paraffiniert worden waren; die Schichtdicke in allen anderen Systemen betrug 500 µ.
Die folgende Tabelle 17 enthält die nach der obigen Methode aus Flieder- und Spinatblättern isolierten Verbindungen.

Tabelle 17: Isolierte Verbindungen aus Flieder (F)- und Spinatchloroplasten (S) mit den Rf-Werten in verschiedenen Trennsystemen

Zonen-bezeichnung	Rf-Werte System I	System II	System III	System II (PQ-9 = 0,89 gesetzt)
F1	0,75	0,82		0,89(0,89)
F12		0,75		
F2	0,62	0,84 0,17	0,95 0,17	0,91
F3	0,59	0,86 0,18	0,95 0,17	0,93(0,94)
F4	0,50	0,86 0,19	0,95 0,17	0,93
F5	0,47-0,29	0,83 0,75 0,68		
F54		0,50		0,54(0,55)
F61	0,25 0,095 0,015	0,67	0,89	0,73(0,70)
F612			0,63 0,51	
F7	0,20	0,65 0,23	0,56	0,71
F81	0,091	0,55	0,66 0,60	0,57(0,58)
F82		0,41	0,84 0,79	0,44(0,45)
F91	0,042	0,36 0,079 0,049		0,29(0,26)
S1	0,82	0,83	0,03	0,89(0,89)
S112			0,19	
S2	0,71	0,79	0,54	0,85(0,94)
S3	0,67		0,37	
S4	0,54	0,75	0,63	
S52		0,82 0,54 0,47		0,58(0,55)
S6	0,33	0,70		0,75(0,70)
S8	0,12	0,58		0,62(0,58)
S91	0,07	0,26		0,28(0,26)

Aufgeführt und weiter aufgetrennt wurden in Tabelle 17 nur die Zonen, die sich im System I mit LMB- bzw. EE-Reagenz (s.S.67f.) anfärben ließen (Wartezeit bis 24 Stdn.). Die Rf-Werte der Spalte 3 sind in Spalte 5 (PQ-9 = 0,89 gesetzt) auf die von Dilley[35] im gleichen System gefundenen Werte zum besseren Vergleich umgerechnet worden (Werte der Autoren in Klammern dahinter). Unterstrichene Rf-Werte kennzeichnen bei mehreren Zonen die jeweiligen Hauptmengen.

Eine Übersicht der wichtigsten in der Literatur verwendeten Trennsysteme an Dünnschichtplatten gibt zum Vergleich Tabelle 18.

Tabelle 18: Rf -Werte einiger natürlicher Chinone in verschiedenen Trennsystemen auf Kieselgel G (250 µ Schichtdicke)

Lösungsmittelsysteme	PQ-9	PQ-B	PQ-C	PQ-D	α-TQ	Literatur
1) Äther/$CHCl_3$(1:99)	1,0	0,97	0,68	0,56	0,29	46)
2) Äthylacetat/Benzol (12:88)	1,0	0,94	0,76	0,66	0,48	46)
3) Chloroform	0,74 0,90	0,78 0,90	0,49 0,67	0,40 0,61	0,37 0,43	7)
4) Benzol	0,74	0,75	0,12	0,08	0,05	7)
5) Benzol/Heptan (60:40)	0,37	0,40	0,06	0,03	0,02	7)

Das relative Mengenverhältnis der Chinone F1(PQ-9):(F2+F3): F4:F7:F81:F82 beträgt 16:3:1:1:3:2 (F7 = 1 gesetzt).
Der Gehalt der Fliederblätter an PQ-9 wurde zu 0,3g PQ-9/kg Trockengewicht bestimmt.
In allen 3 Systemen (Tabelle 17) verhielten sich die Zonen

F1 und S1	wie PQ-9
F12 und S112	wie Vitamin K_1
F61 und S6	wie Q-10
F91 und S91	wie α-TQ

Die Zonen F2 und F3 (entsprechend S2 und S3) ließen sich in den verschiedensten Systemen nicht hinreichend voneinander trennen, wie die folgende Tabelle 19 zeigt:

System	Rf.(F2/F3)
$CHCl_3$	0,70/0,65
CCl_4	0,60/0,52
Benzol/Petroläther(4:1)	0,54/0,54
Cyclohexan	0,75/0,70
CCl_4/1% Äther	0,87/0,82
$CCl_4/CHCl_3$ (4:1)	0,79/0,75
CCl_4/Benzol (3:2)	0,73/0,67

In einigen Systemen z.B. Benzol Rf. 0,48 (Hauptmenge) und 0,12 trat offenbar Zersetzung ein, da die untere Zone im UV kein Chinonspektrum mehr zeigte.

F4 und S4 verhielten sich sowohl in den Systemen

1)	Benzol	Rf: 0,46
2)	Petroläther/$CHCl_3$ (1:1)	0,57
3)	Petroläther/Äther (7:1)	0,88

als auch auf paraffiniertem Kieselgel (s.S.40) wie synthetisches Plastochinon-1 (PQ-1).

Die Zonen F54 und S52 wurden mit einigen durch Natriumborhydrid-Reduktion erhaltenen Hydrochinonen der folgenden Chinone verglichen:

Tabelle 20: Rf-Werte einiger Hydrochinone in Chloroform (250 µ Kieselgel G)

Chinon	Rf. des Hydrochinons
Q-10	0,55
PQ-9	0,51
PQ-4	0,33
α-TQ	0,08
PQ-0	0,03
F54/S52	0,50

F61 erweist sich in den Systemen

1) Benzol/1% Methanol	Rf: 0,56
2) Petroläther/$CHCl_3$ (1:1)	0,46
3) Benzol	0,29
4) System III	0,89

mit authentischem Ubichinon-10 (Q-10) identisch.
F612 verhält sich wie Ubichinon-7 (Q-7) auf paraffiniertem Kieselgel, wenn man authentisches Q-10 und Q-6 als Eichsubstanzen der Kettenlängenbestimmung zugrunde legt.
Eine entsprechende Zone wurde in Spinat nicht gefunden.

F7 wurde im System II und auf paraffinierten Kieselgel (s.S.40) mit synthetischem Plastochinon-4 (PQ-4) verglichen. Die Rf-Werte beider Verbindungen zeigten (auch bei der Kochromatographie) keinerlei Abweichung voneinander.
Spinat enthält die Substanz nicht.

Die Zonen F81 und S8 sind möglicherweise mit Plastochinon-C (PQ-C) identisch, wie sich aus dem Rf-Wert Vergleich in Spalte 5 der Tabelle 17 S.35 ergibt. Allerdings besteht F81 mindestens aus 2 Chinonen, die sich im System III voneinander trennen.

Bei F82 könnte es sich aus den gleichen Gründen um Plastochinon-D (PQ-D) handeln. Auch diese Zone trennt sich im System III in 2 Chinone auf. In Spinat wurde sie nicht gefunden.

Entsprechend den Ubichinonen trennen sich auch Plastochinone gleichen Substitutionstyps aber unterschiedlicher isoprenoider Kettenlänge an Dünnschichtplatten mit konstanter Rf-Differenz auf. Die besten Resultate erzielt man nach dem Phasenumkehrverfahren auf paraffinierten Schichten.
Je länger die Seitenkette des Chinons ist um so kleiner ist sein Rf-Wert. Trägt man die Rf-Werte der verschiedenen Chinone gegen die Anzahl der C-Atome in der Seitenkette graphisch auf, so erhält man eine Gerade.
Zur Ermittlung einer Eichkurve wurden die Plastochinone (PQ-0 bis PQ-9) der Tabelle 21 herangezogen.
Das Ergebnis zeigt Abb.6 S.40. Eingetragen in die graphische Darstellung sind ferner die Zonen F4, S4 und F7 der Spinat- bzw. Fliederaufarbeitung (Tabelle 17 S.35).

Tabelle 21: Rf-Werte verschiedener Chinone auf paraffiniertem Kieselgel G (250 µ Schichtdicke).

Substanz	Rf-Wert
2,3- Dimethyl-p-benzochinon (PQ-0)	0,86
PQ-1	0,78
PQ-3	0,62
PQ-4	0,53
PQ-9	0,09
α-TQ	0,76
2,3-Dimethyl-5-phythyl-p-benzochinon	0,34
F4/S4	0,79
F7	0,52

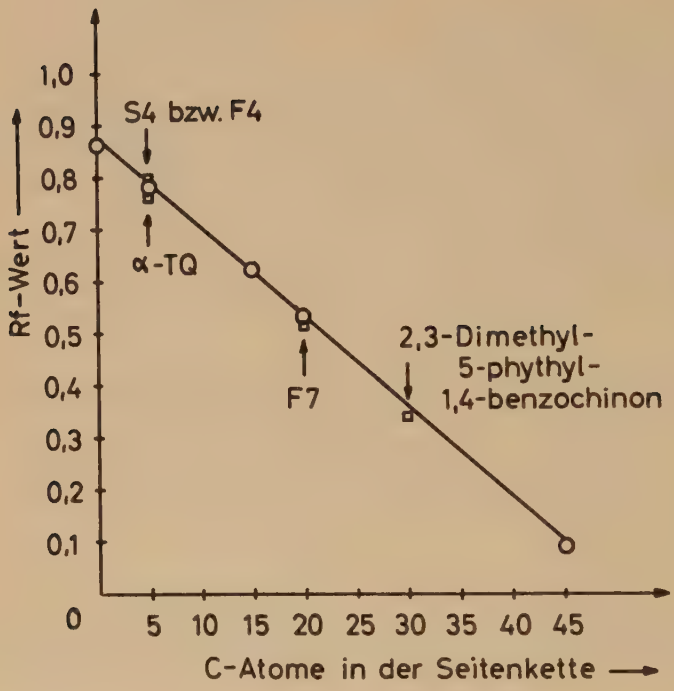


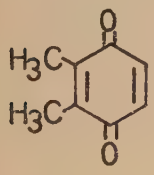
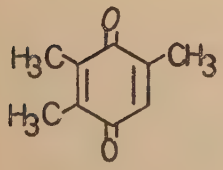
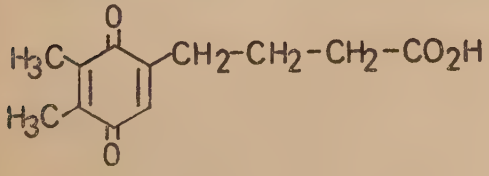
Abb.6: Trennung verschiedener Plastochinone unterschiedlicher Kettenlänge auf paraffiniertem Kieselgel G (0,75 mm Schichtdicke, Laufmittel: Paraffingesättigtes 96 proz. Äthanol)

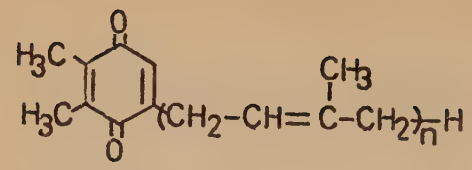
Nach dieser einfachen Methode lassen sich also schnell Aussagen über die zu erwartende Seitenkettenlänge von Chinonen des Ubichinon- und Plastochinontyps machen.
Verbindungen mit teilweise hydrierter Seitenkette oder mit funktionellen Gruppen in der Kette wie z.B. 2,3-Dimethyl-5-phythyl-p-benzochinon und α-TQ fügen sich nicht ihrer Kettenlänge gemäß in diese homologe Reihe ein.

Farbreaktionen

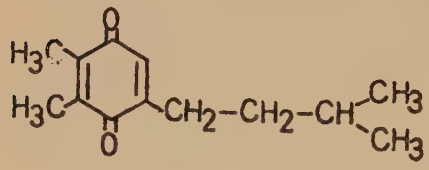
Zwei Reaktionen werden zum qualitativen und quantitativen Nachweis von isoprenoiden Chinonen herangezogen. Es sind die nach Craven[36] und Dam und Karrer[37] benannten Farbreaktionen. Sie werden hier auf die in Tabelle 22 u. aufgeführten isolierten Verbindungen und zum Vergleich auf eine Reihe synthetischer Chinone angewendet.
Im Falle des Craven-Testes (CT) wird die alkoholische Lösung des Chinons mit einigen Tropfen Cyanessigsäureäthylester und einer Mischung von absolutem Äthanol und Ammoniak im Verhältnis 1:1 versetzt.
Beim Dam-Karrer-Test (DK) gibt man zu der alkoholischen Lösung des Chinons 0,5 ml einer 5 proz. methanolischen Kalilauge. Die folgende Tabelle 22 enthält einige synthetisch dargestellte p-Benzochinone, die nach Craven und Dam-Karrer auf die beschriebene Weise getestet wurden.

Tabelle 22: Ergebnisse von Farbreaktionen mit verschiedenen synthetischen p-Benzochinonen

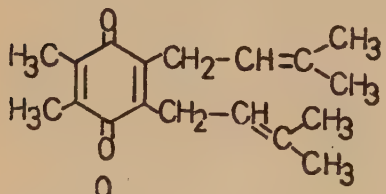
Verbindungstyp	Craven-Test	Dam-Karrer Test
	+	-
	+	-
	+	-



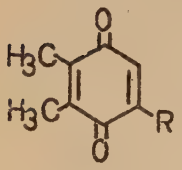
\+ +



\+ -

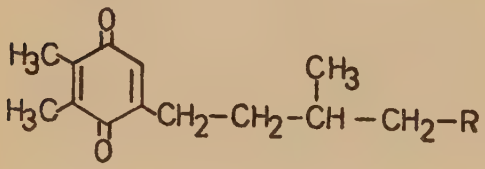


\- -

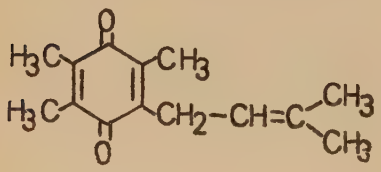


R = Phythyl

\+ +



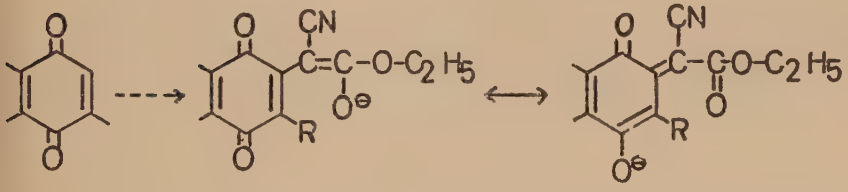
\+ -



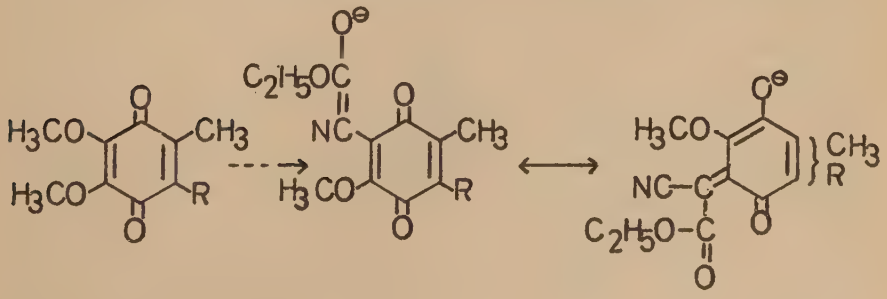
\- -

(+ bedeutet positive Reaktion, d.h. Blaufärbung)

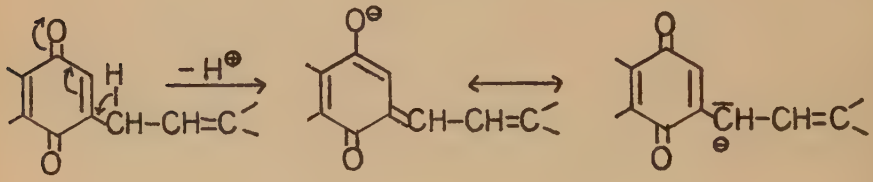
Aus der Tabelle 22 ersieht man, daß im Falle des Craven-Tests lediglich das Vorhandensein mindestens eines freien H-Atoms in Nachbarschaft zu den Carbonylgruppen des Chinons für das Eintreten der Farbreaktion erforderlich ist.
Der Craven-Test sollte also Aufschluß darüber geben, ob man in einem substituierten p-Benzochinon noch mit einer unsubstituierten Position am Chinonteil rechnen kann oder nicht.
Für die Bildung des blauen Farbstoffs wird folgender Mecnanismus vorgeschlagen[38,39,40].



Bei Halogen- bzw. Methoxylsubstitution fällt der Test allerdings auch dann positiv aus, wenn keine freie Position am Chinonteil mehr vorhanden ist. Die Erklärung ist, daß z.B. in den Ubichinonen die Methoxylgruppen durch das Cyanoacetat ersetzbar sind, was dann im Endeffekt zu einer analogen Mesomerie wie oben führt[41].



Der Dam-Karrer-Test erfordert das Vorhandensein eines in α-Stellung zum Chinonteil aktivierten H-Atoms wie man ebenfalls der Tabelle 22 S.42 entnehmen kann. Die erste isoprenoide Doppelbindung in β-Stellung zum Chinon erfüllt diese Voraussetzung in sämtlichen der untersuchten Fälle. Naphthochinone z.B. Vitamin K_1 reagieren entsprechend den p-Benzochinonen. Der Mechanismus besteht offenbar in der folgenden Mesomeriemöglichkeit der chinoiden Verbindung[42].



Zur Identifizierung von Hydrochinonen auf Dünnschichtplatten hat sich das Emmerie-Engel-Reagenz (EE) mit α,α'-Dipyridyl und Eisen-III-chlorid bewährt. Die abschließende Tabelle 23 enthält die Ergebnisse der verschiedenen Farbteste mit den in Tabelle 17 S.35 aufgeführten isolierten Verbindungen.

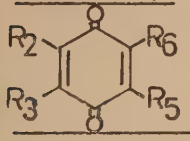
Tabelle 23: Farbreaktionen der aus Flieder und Spinat isolierten Chinone und Hydrochinone

Zonen-bezeichnung	DK	EE	CT	Zonen-bezeichnung	DK	EE	CT
F1	+			S1	+		+
F12	+						
F2	+			S2			
F3	+			S3	+		
F4	+			S4	+		
F51		+		S51		+	
F52		+		S52		+	
F53		+		S53		+	
F54		+					
F61			+				
F612			+				
F7	+						
F811	+			S8	+		
F812	+		+				
F821	+						
F822	+		+				

UV-Spektroskopie

Die Elektronenspektren von substituierten p-Benzochinonen sind von Flaig et al[43] eingehend untersucht worden. Sie zeigen im UV-Bereich ein in zwei Banden unterteiltes Maximum. Die 1. Bande liegt je nach Art, Stellung und Anzahl der Substituenten zwischen 240 und 280 mμ. Sie wird zur Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten der Chinone, zur Überprüfung der Reinheit im Zusammenhang mit dem Minimum bei 220 mμ und zur quantitativen Bestimmung im Vergleich mit der an der gleichen Stelle des Spektrums gemessenen Extinktion der reduzierten Verbindung herangezogen.
Die 2. Bande, die in der Mehrzahl der Fälle als Schulter ausgebildet ist, liegt ziemlich unabhängig vom Substitutionstyp in der Nähe von 260 mμ. Die entsprechenden Hydrochinone zeigen eine Absorptionsbande bei 290 mμ.
Die Spektren werden in der Regel in absolutem Äthanol aufgenommen. In diesem Lösungsmittel läßt sich nach Zusatz von Natriumborhydrid leicht auch die reduzierte Verbindung messen.
Die folgende Tabelle 24 enthält die Daten der UV-Spektren einiger in diesem Zusammenhang untersuchter p-Benzochinone.

Tabelle 24: Daten der UV-Spektren (in Äthanol) einiger verschieden substituierter p-Benzochinone



	1.Bande λ (mμ)	2.Bande λ (mμ)	Nach Red. mit $NaBH_4$ λ (mμ)
$R_2=R_3=R_5=R_6=H$	242	-	294
$R_2=CH_3$	246	-	293
$R_2=R_3=CH_3$	248	-	293
$R_2=R_6=CH_3$	254	264S	290
$R_2=R_5=CH_3$	252	256S	293
$R_2=R_3=R_6=CH_3$	256	262S	283
$R_2=R_3=CH_3$ $R_5= -(CH_2)_3-CO_2H$	256	262S	290
$R_2=R_3=R_5=R_6=CH_3$	266	260S	283
Ubichinon-10	275	-	290
Plastochinone	255	262S	290

Die UV-Absorptionen der aus Flieder und Spinat isolierten Verbindungen folgen hier zum Vergleich in Tabelle 25.

Tabelle 25: UV-Absorptionen der aus Flieder und Spinat isolierten Verbindungen (oxydiert in Äther und reduziert in absolutem Äthanol gemessen)

Zonen-bezeich-nung	UV-Absorption oxydiert λ (mμ)	red. λ (mμ)	Zonen-bezeich-nung	UV-Absorption oxydiert λ (mμ)	red. λ (mμ)
F1	253,260S	290	S1	253,260S	290
F12	242,247,260,268	244			
F2	253,260S	290	S2		
F3	253,260S	290	S3	253,260S	290
F4	253,260S	290	S4	255,260S	290
F51		296	S51		292
F52		292	S52		294
F53		290	S53		300
F54		290			
F61	270	290	S6	270	290
F612	270	290			
F7	253,260S	290			
F811	253,260S	290	S8	253,260S	290
F812	253,260S	290			
F821	253,260S	290			
F822	253,260S	290			
F911	260,267	287	S91	260,268	288
F912	233,270				
F913	233,270				

Die folgenden Abb.7 bis 12 zeigen die vollständigen UV-Spektren einiger in Tabelle 25 aufgeführten Verbindungen.

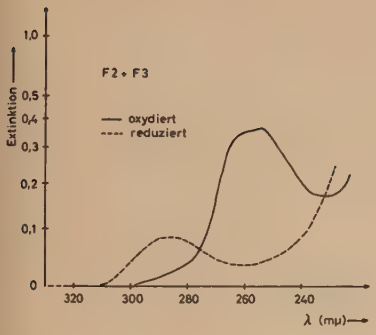


Abb. 7: UV-Spektrum des Plastochinon-B in Äthanol (Zonen F2+F3)

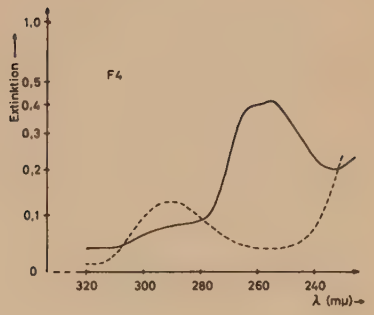


Abb.8: UV-Spektrum des Plastochinon-1 in Äthanol (Zone F4)

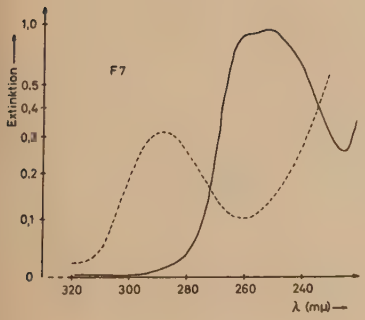


Abb. 9: UV-Spektrum des Plastochinon-4 im Ätnanol (Zone F7)

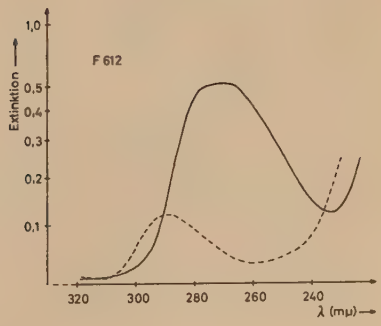


Abb.10: UV-Spektrum des Ubichinon-7 in Äthanol (Zone F612)

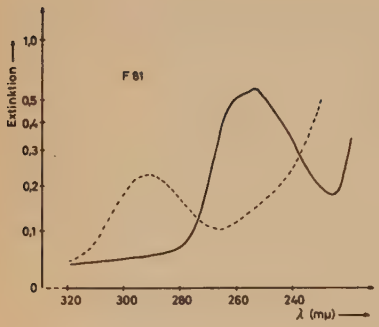


Abb.11: UV-Spektrum des Plastochinon-C in Äthanol (Zone F81)

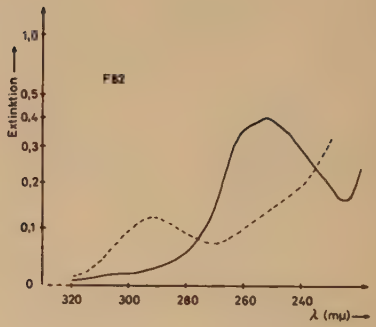


Abb.12: UV-Spektrum des Plastochinon-B in Äthanol (Zone F82)

Molekulargewichte von Chinonen lassen sich bei Kenntnis des molaren Extinktionskoeffizienten aus der Extinktion einer vorgegebenen in ihrer Konzentration bekannten Lösung berechnen (s.S.69).
Zur Charakterisierung von Chinonen unbekannten Molgewichtes dient die Extinktion ihrer 1% Lösungen $E_{1cm}^{1\%}$
Bei gut gereinigten isoprenoiden Chinonen lassen sich Extinktionswerte auch zur Bestimmung der Kettenlänge verwenden.

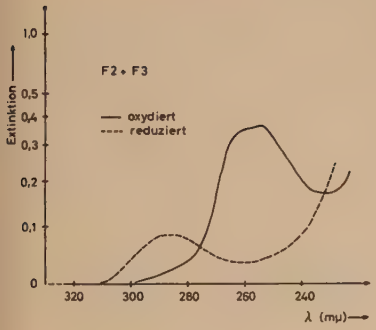


Abb. 7: UV-Spektrum des Plastochinon-B in Äthanol (Zonen F2+F3)

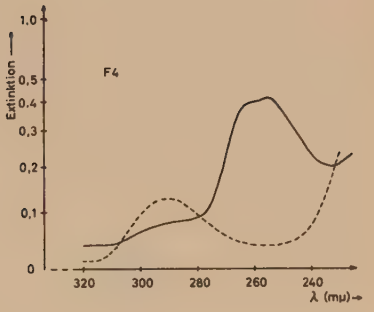


Abb.8: UV-Spektrum des Plastochinon-1 in Äthanol (Zone F4)

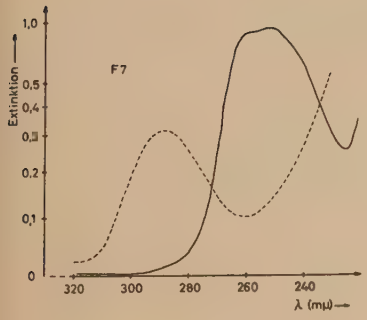


Abb. 9: UV-Spektrum des Plastochinon-4 im Ätnanol (Zone F7)

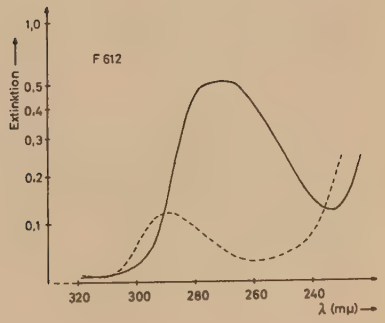


Abb.10: UV-Spektrum des Ubichinon-7 in Äthanol (Zone F612)

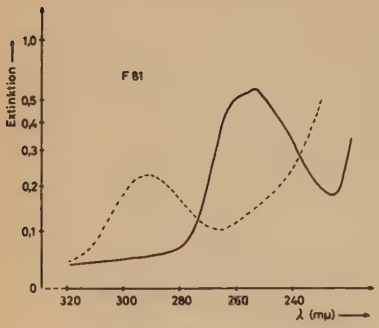


Abb.11: UV-Spektrum des Plastochinon-C in Äthanol (Zone F81)

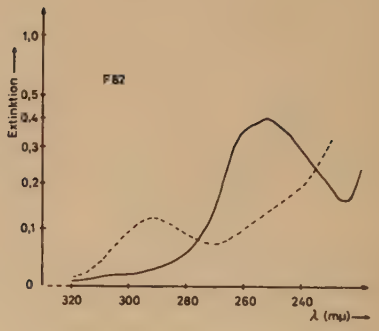


Abb.12: UV-Spektrum des Plastochinon-B in Äthanol (Zone F82)

Molekulargewichte von Chinonen lassen sich bei Kenntnis des molaren Extinktionskoeffizienten aus der Extinktion einer vorgegebenen in ihrer Konzentration bekannten Lösung berechnen (s.S.69).
Zur Charakterisierung von Chinonen unbekannten Molgewichtes dient die Extinktion ihrer 1% Lösungen $E^{1\%}_{1cm}$
Bei gut gereinigten isoprenoiden Chinonen lassen sich Extinktionswerte auch zur Bestimmung der Kettenlänge verwenden.

IR-Spektroskopie

Die IR-Spektroskopie hat für die Konstitutionsermittlung von isoprenoiden p-Benzochinonen keine große Bedeutung erlangt. Das liegt z.T. an der oft schlechten substanzbedingten Auswertbarkeit der Spektren im Isoprenoidbereich und an der schwierigeren Zuordnung der Banden ganz allgemein.

Folgende Banden lassen sich zur näheren Charakterisierung des Chinons mit heranziehen:

Tabelle 26: Lage und Zuordnung einiger IR-Absorptionsbanden des PQ-9 (Fest in KBr aufgenommen)

Strukturelement	Frequenzen cm^{-1}	Frequenzen μ	Bemerkungen
	1670 1600	6,0 6,3	Benzochinonbanden
Isoprenoide Kette		11-14	3 Banden nur im kristallisierten Zustand

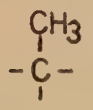
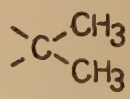
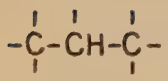
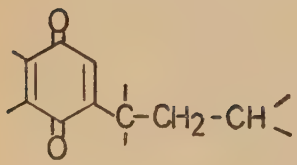
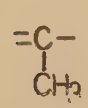
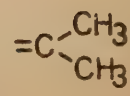
Die Spektren werden gewöhnlich fest in KBr oder als Öl direkt bzw. in Lösungsmitteln aufgenommen.
Das IR-Spektrum der Zonen F2+F3 in Chloroform zeigt folgende Absorptionen:

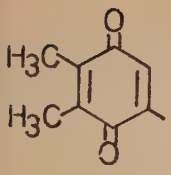
ν (μ): 3,33-3,4-3,51-4,48-5,17-5,49-5,84-6,1-7,3-7,5
7,75-7,8-8,1-8,6-9,3-9,5-10,2-10,35-12,0

NMR-Spektroskopie

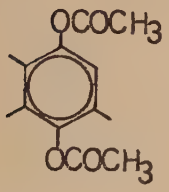
Im Gegensatz zur IR-Spektroskopie ist die NMR-Spektroskopie für die Strukturaufklärung isoprenoider Chinone von großer Bedeutung.
Sie erlaubt detaillierte Aussagen über die chemische Natur, die Anzahl und die Bindungsart der Protonen im Chinonteil und in der Seitenkette. Außerdem lassen sich die Länge und die Isomerieverhältnisse in der Seitenkette ermitteln.
Die folgende Tabelle 27 vermittelt eine Übersicht über Lage und Zuordnung einer Reihe in isoprenoiden p-Benzochinonen vorkommender Protonensignale (Angaben in ppm für $CDCl_3$, Tetramethylsilan als innerer Standard). Die Werte ergaben sich aus den Spektren einer Anzahl für Vergleichszwecke synthetisch dargestellter Verbindungen (s. folgendes Kapitel S.53).

Tabell 27: Lage und Zuordnung einiger in isoprenoiden p-Benzochinonen auftretender Protonenresonanzsignale

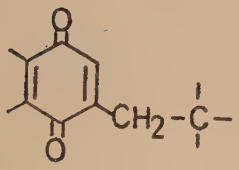
Struktur	Lage des Signals δ (ppm)	Bemerkungen
	0,84 - 0,95	einschl. 
	1,20	
	1,27 - 1,30	m
	1,60 - 1,70	einschl. 



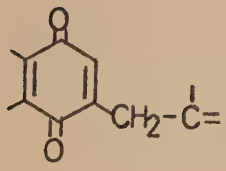
2,01 - 2,06 einschl. $-CH_2-\overset{|}{C}=$



2,31

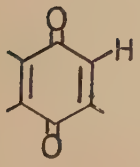


2,46 m



3,12 - 3,22 d

$-CH=C-$ 4,93 - 5,17 t



6,47 - 6,54 t

Abkürzungen: m - Multiplett, t - Triplett, d - Doublett

Zur Veranschaulichung der Tabelle 27 folgt hier die vollständige Abbildung des NMR-Spektrums des synthetisch dargestellten Plastochinon-1 (PQ-1).

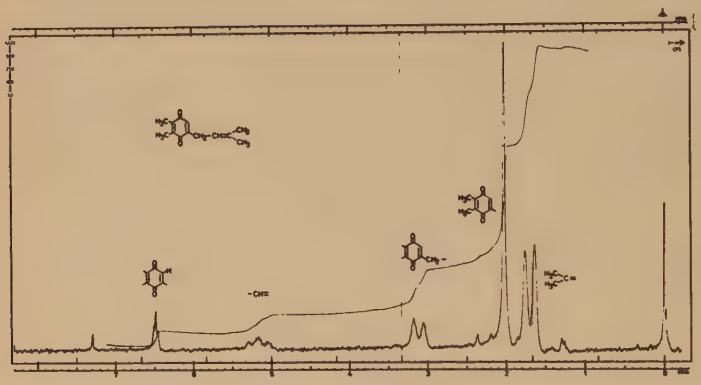


Abb.13: NMR-Spektrum des PQ-1 in $CDCl_3$ (TMS als innerer Standard)

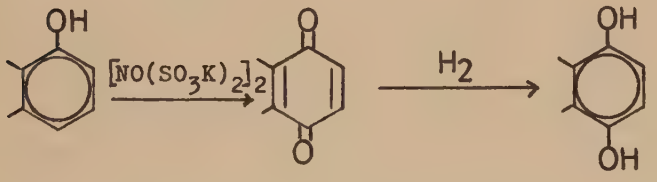
Die in den NMR-Spektren der Zonen F2+F3 gefundenen Protonensignale sind in der folgenden Tabelle 28 zusammengestellt. Das Spektrum des PQ-9-Diacetats ist zum besseren Vergleich in die Tabelle mit aufgenommen worden.

Tabelle 28: Lage der Protonensignale in den NMR-Spektren der Zonen F2+F3 in $CDCl_3$ (TMS als innerer Standard)

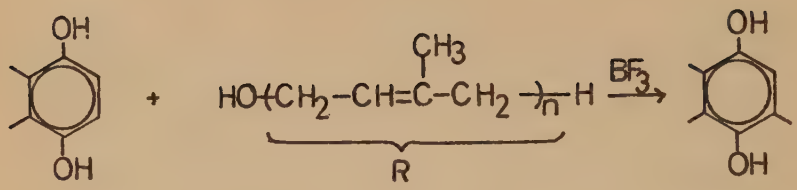
Zonenbezeichnung	Lage der Protonensignale in ppm (δ-Werte)		
F2+F3	5,21-3,78-2,66	1,87-1,47-1,13-0,84	
F2+F3	5,09-3,62-2,61	2,01-1,60-1,24-0,88	
Fe+F3 (acetyliert)	5,35	2,80-2,28-2,02-1,58-1,25-0,83	
PQ-9-Diacetat	6,78-5,16	2,60-2,31-2,08-1,62	

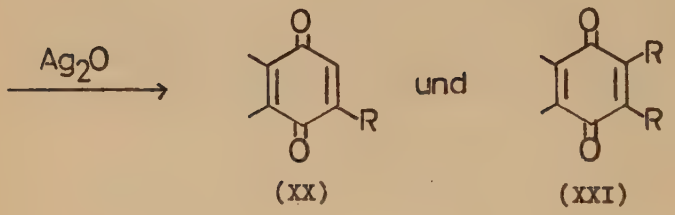
Synthesen einiger p-Benzochinone mit isoprenoider Seitenkette

Zum chromatographischen und spektroskopischen Vergleich mit den aus Flieder und Spinat isolierten Chinonen (Tabelle 17 S.35) wurden eine Reihe p-Benzochinone mit isoprenoider Seitenkette hergestellt. Die Verbindungen wurden durch Friedel-Crafts-Kondensation eines entsprechend substituierten Hydrochinons mit Polyisoprenalkoholen erhalten[44]. Die 2,3-Dimethyl- bzw. 2,3,6-Trimethyl-substituierten Hydrochinone, die als Ausgangsverbindungen verwendet wurden, waren aus den entsprechenden Phenolen durch Oxydation mit Kaliumnitrosodisulfonat und anschließender katalytischer Hydrierung mit Palladium auf Bariumsulfat in Dioxan zugänglich.



Die aus den Chinonen erhaltenen Hydrochinone wurden nicht isoliert, sondern gleich nach Abzentrifugieren des Katalysators mit den Isoprenalkoholen umgesetzt. Als Alkohole wurden eingesetzt: Dimethylallylalkohol, Citronellol, Farnesol und Phythol.
Die Kondensation wurde in absolutem Dioxan mit Bortrifluorid-Ätherat als Katalysator unter Stickstoff bei 50° ausgeführt. Das Hydrochinon-Kondensationsprodukt läßt sich nach Abblasen des Ätherats im Stickstoffstrom mit Silberoxid im gleichen Ansatz zum entsprechenden Chinon aufoxydieren.





Bei der Kondensation von 2,3-substituierten Hydrochinonen bildet sich stets auch neben dem trisubstituierten Produkt (XX) tetrasubstituiertes (XXI) in gleicher Menge.
Hydriert man nach erfolgter Kondensation abermals mit Palladium auf Bariumsulfat und oxydiert dann mit Silberoxyd, erhält man zu (XX) und (XXI) analoge in der Seitenkette gesättigte Chinone.
Zur Isolierung und Reinigung der Verbindungen wurden Kieselgel-Säulen und die Methodik der präparativen Dünnschichtchromatographie verwendet. Dabei wurden alle Verbindungen als gelbe zähflüssige Öle erhalten.
Die jeweilige Konstitution der Chinone wurde durch UV- und NMR-Spektroskopie aufgeklärt.
Folgende, in Tabelle 29 zusammengestellten p-Benzochinone, wurden hergestellt:

Tabelle 29: Synthetische p-Benzochinone mit isoprenoider Seitenkette mit den Daten ihrer UV-Spektren (in Äthanol) und Farbteste

Substituent	UV-Spektrum oxyd. λ(mμ)	red. λ(mμ)	CT	DK	
1) 2,3-Dimethyl-5-dimethylallyl-	260,255	290	+	+	PQ-1
2) 2,3-Dimethyl-5,6-dimethylallyl-	267,260S	286	-	-	
3) 2,3-Dimethyl-5-methylbutan-(2)-	262S,257	290	+	-	
4) 2,3-Dimethyl-5,6-methylbutan-(2,2')-	270,264S	286	-	-	
5) 2,3,6-Trimethyl-5-dimethylallyl-	266S,258	285	-	-	
6) 2,3-Dimethyl-5-citronellyl-	260S,254	291	+	+	PQ-2
7) 2,3-Dimethyl-5-farnesyl-	260S,255	290	+	+	PQ-3
8) 2,3-Dimethyl-5,6-farnesyl-	260S,258	-	-	-	in Ae.
9) 2,3,6-Trimethyl-5-farnesyl-	266S,258	287	-	-	
0) 2,3-Dimethyl-5-phythyl-	260S,255	290	+	+	
1) 2,3-Dimethyl-5,6-phythyl-	266S,260	285	-	-	

Angaben über die NMR-Spektren der Verbindungen in Tabelle 29 finden sich auf S. 50 f.

Diskussion

Seit der Entdeckung des Plastochinon-9 (PQ-9) durch Kofler[3] 1946 sind in den letzten Jahren eine Reihe weiterer p-Benzochinone in pflanzlichem Material aufgefunden worden.
Die z.Zt. bekannten Chinone aus Spinat und Kastanienblättern enthält die folgende Tabelle 30:

Tabelle 30: Aus Spinat und Kastanienblättern isolierte p-Benzochinone mit den Daten ihrer UV-Spektren in Äthanol

Bezeichnung d.Verbindung	UV-Spektrum oxyd.	red. λ (mμ)	Literatur	Bemerkungen zur Struktur
PQ-9	255,262S	290	Kofler (1946) Henninger u. Crane (1964)	2,3-Dimethyl-solanosyl-1,4-benzochinon
PQ-4	255,260S	290	Eck u. Trebst (1963)	2,3-Dimethyl-citronellyl-1,4-benzochinon
PQ-3	253,261S	289	Folkers et al (1965)	2,3-Dimethyl-farnesyl-1,4-benzochinon
PQ-B	255,262S	290	Kegel et al (1962)	Dehydriertes PQ-9
PQ-C	255,262S	290	Henninger u. Crane (1963)	Hydroxyliertes PQ-9
PQ-D	255,262S	290	vorstehende	Isomeres PQ-C
α-TQ	261,269S	290	Dilley u. Crane (1963)	2,3,6-Trimethyl-5-(2'-dihydro-3'-hydroxyphythyl-1,4-benzochinon
β-TQ	261		Henninger u. Crane (1963)	3,6-Dimethyl-substituiertes α-TQ
γ-TQ	258		Booth (1961-63)	2,3-Dimethyl-substituiertes α-TQ
$(PQ-9)_2$			Eck u. Trebst (1963)	Dimere des PQ-9
$(PQ-4)_2$				und PQ-4
R 263	263		Henninger u. Crane (1964)	Zerfallsprodukt von PQ-C?

Einige dieser Chinone (PQ-9; PQ-4 und PQ-3) unterscheiden sich nur in der Länge ihrer isoprenoiden Seitenkette. Von größerem Interesse sind die von Crane et al beschriebenen Plastochinone B, C und D, da sie in der Struktur ihrer Seitenketten gegenüber dem PQ-9 abgewandelt sind. Sie weisen offenbar - wenn auch in geringerer Menge - eine ähnliche Verbreitung in grünen Pflanzen auf wie PQ-9 und kommen wie dieses in Chloroplasten vor. Das könnte auf eine mögliche Beteiligung dieser Verbindungen an photosynthetischen Reaktionen hindeuten.
Es erschien aussichtsreich zu sein, weitere Chinone dieses Typs aus Fliederblättern (Syringa vulgaris) zu isolieren, da sie nach Egger[31], im Herbst geerntet, größere Mengen dieser Nebenchinone enthalten sollten.
Nach einem kontinuierlichen Verfahren wurden daraufhin Fliederchloroplasten hergestellt und mit Heptan/Propanol/Wasser im Verhältnis 1:1:1,5 extrahiert. In einem Parallelansatz wurden zum Vergleich Spinatblätter der gleichen Behandlung unterworfen.

Die Aufarbeitung der Rohextrakte durch Säulen- und Dünnschichtchromatographie brachte folgendes Ergebnis:

Plastochinone

Beide Pflanzen enthalten wie zu erwarten PQ-9 (PQ-A), das als einziges Chinon bisher und auch hier in kristalliner Form isoliert werden konnte. Die Verbindung verhielt sich bei Farbtesten und dünnschichtchromatographisch wie authentisches PQ-9. Ihre Konstitution wurde durch UV (253,260S/290 mμ)- und NMR-Spektren nachgewiesen. Der Gehalt der Fliederblätter an PQ-9 ergab sich zu 0,3 g/kg Trockengewicht.

Auch Plastohydrochinon-9 (von Crane in Spinat nachgewiesen) war sowohl in Spinat als auch in Flieder zugegen. Die Identität der farblosen Verbindung ergab sich aus dem UV-Spektrum (290 mμ) und dem chromatographischen Verhalten im Vergleich mit einer Reihe von Hydrochinonen, die aus bekannten Chinonen durch Reduktion mit Natriumborhydrid erhalten wurden (Tabelle 20 S.38). Hinweise für weitere 3 Hydrochinone in Flieder und 2 in Spinat ergaben sich neben ihren positiven Emmerie-Engel-Reaktionen aus den entsprechenden UV-Spektren.

Flieder enthält wie Kastanienblätter (Eck u. Trebst) im Gegensatz zu Spinat offenbar auch PQ-4. Für das in geringen Mengen (1/16 des PQ-9) isolierte Produkt ergab sich auf paraffiniertem Kieselgel eine Kettenlänge von 20 C-Atomen (Abb.6 S.40). Plastochinone gleichen Substitutionstyps aber unterschiedlicher isoprenoider Kettenlänge trennen sich bei dieser Phasenumkehr-Chromatographie mit konstanter Rf-Differenz auf, so daß sich die Kettenlängen homologer Chinone ermitteln lassen.

Die Verbindung verhält sich darüber hinaus in einer Reihe weiterer Chromatographiesysteme wie synthetisches PQ-4. Farbtests und UV-Spektren sind in Übereinstimmung mit einem trisubstituierten p-Benzochinon.

Bei den Zonen F4 und S4 (Tabelle 17 S.35) handelt es sich dem chromatographischen Verhalten nach um PQ-1. Im paraffinierten System (Abb.6 S.40) ergibt sich eine Kettenlänge von 5 C-Atomen. Die Zonen sind in den unterschiedlichsten Systemen (S.37) - auch bei der Kochromatographie - mit synthetischem PQ-1 identisch. Farbteste und UV-Spektren lassen sich nur mit einem trisubstituierten p-Benzochinon in Übereinstimmung bringen.

Substanzen, die als Chinone des B-, C- und D-Typs in Frage kamen, waren in beiden Extrakten enthalten. Ihre Zuordnung zur Nomenklatur von Crane bereitete insofern Schwierigkeiten als keine Vergleichssubstanzen dieser Chinone zur Verfügung standen. Der Vergleich mit den von Crane et al[7] beschriebenen Verbindungen stützt sich darum nur auf die von den Autoren angegebenen Rf-Werte in verschiedenen Dünnschichtsystemen. Danach bestand für die Zonen F2 und F3 bzw. S2 und S3 (Tabelle 17 S.35) die Möglichkeit, mit PQ-B identisch zu sein.
Eine vollständige chromatographische Trennung dieser Verbindungen gelang jedoch in keinem der 14 untersuchten Trennsysteme. Farbteste und UV-Spektren weisen eindeutig auf trisubstituierte p-Benzochinone hin (Tabelle 25 S.46). Bei der Chromatographie auf Dünnschichtplatten zersetzte sich ein Teil der Substanzen, wie am Auftreten weiterer Zonen ohne

Chinonspektrum im UV beobachtet wurde. Die Substanz wurde deshalb reduzierend acetyliert. Die isolierte Menge (18 mg) reichte zur Aufnahme eines NMR-Spektrums aus. Die Protonensignale des Spektrums lassen sich jedoch nicht eindeutig einer bestimmten Verbindung zuordnen. Auffallend ist jedenfalls, daß abweichend vom PQ-9 innerhalb der Kette bestimmte Isopreneinheiten hydriert vorzuliegen scheinen, wie aus den Signalen bei δ = 0,83 und 1,25 ppm geschlossen werden kann. Das steht im Widerspruch zu den massenspektroskopischen Befunden von Lederer[45], der das PQ-B als dehydriertes PQ-9 beschreibt. F2 + F3 und S2 + S3 sind offenbar Gemische aus PQ-B und einem weiteren Benzochinon mit teilweise gesättigter Seitenkette. Auch Griffiths et al[46] berichten kürzlich in diesem Zusammenhang über weitere Chinone des B-Typs ($PQ\text{-}B_1$ bis $PQ\text{-}B_6$).

Die Zonen F81 und S8 (Tabelle 17 S.35) zeigen große chromatographische Ähnlichkeit mit PQ-C ebenso wie die in Spinat nicht gefundene Zone F82 mit PQ-D. Farbteste und UV-Spektren aller Substanzen entsprechen trisubstituierten p-Benzochinonen. F81 und F82 trennen sich auf paraffiniertem Kieselgel jeweils in zwei Zonen F811 und F822 auf, die möglicherweise mit einigen der Chinone $PQ\text{-}C_1$ bis $PQ\text{-}C_6$ von Griffiths et al (s.o.) vergleichbar sind. Der hier bestätigte Befund, daß PQ-C und D nicht einheitlich sind, beruht vermutlich auf einer Auftrennung isomerer Verbindungen.

Vitamin K_1 (Menadion), das in seinem chromatographischen Verhalten dem PQ-9 sehr ähnlich ist, und früher aus diesem Grunde mit PQ-9 oft verwechselt wurde, konnte ebenfalls aus beiden Extraktionsansätzen gewonnen und anhand seines charakteristischen UV-Spektrums (242-247-260-268/290 mμ) identifiziert werden.

Ubichinone

Von den Ubichinonen, die in dieser Arbeit von geringerem Interesse waren, konnte mit Sicherheit das Q-10 in den Extrakten

durch UV-Spektrum (270/290 mμ) und chromatographischen Vergleich mit synthetischer Substanz auf paraffiniertem Kieselgel nachgewiesen werden.

Ein weiteres Ubichinon (UV: 270/290 mμ) wurde aus Flieder erhalten. Möglicherweise handelt es sich um Q-7 wie eine Kettenlängenbestimmung auf paraffiniertem Kieselgel im Vergleich mit Q-10 und Q-6 ergab. Das wäre allerdings der erste Hinweis für das Auftreten eines weiteren Ubichinons neben Q-10 in pflanzlichem Material.

Tocopherylchinone

Beide Aufarbeitungen enthielten außerdem α-TQ, das durch sein UV-Spektrum (260-267/287 mμ) und mit Vergleichssubstanz chromatographisch charakterisiert wurde. Die Tocopherylchinone stehen in naher Beziehung zu den Plastochinonen. So ist z.B. γ-Tocopherol mit der Chromanolform des PQ-9 identisch. Nach weiteren Verbindungen dieses Typs wurde nicht gesucht.

Flieder (Syringa vulgaris) enthält nach diesen Extraktionsversuchen mit Ausnahme von PQ-3 im wesentlichen alle auch in Spinat aufgefundenen Chinone (Tabelle 30 S.56). Zusätzliche Hinweise ergeben sich für das Vorhandensein von PQ-4, das bisher nur aus Kastanienblättern isoliert wurde, einige weitere Chinone des B- und C-Typs und erstmals für PQ-1.
Die Unterscheidung zwischen C- und D-Chinonen erübrigt sich, da es sich nach Lederer[45] um isomere Verbindungen handeln soll, die sich nur in der Stellung einer Hydroxylgruppe in der Seitenkette unterscheiden und sonst wie PQ-9 aufgebaut sind. Die genaue Struktur dieser Nebenchinone ist allerdings noch nicht bekannt.

Beschreibung der Versuche

Heptan-Propanol-Extraktion von Fliederblättern

5 kg im Oktober geerntete Fliederblätter (Syringa vulgaris) wurden zerschnitten und im Starmix unter Wasserzusatz homogenisiert. Der entstandene Brei (ca. 5 l) wurde entsaftet und in zwei Ansätzen mit folgenden Zusätzen extrahiert:

2,5 l wäßriger Preßsaft
+ 5,5 g Natriumdihydrogenphosphat
7,2 g Dinatriumhydrogenphosphat
1,5 l Heptan/Propanol (1:1)

Puffer (pH 6,0) für 600 ml Wasser

Das Gemisch wurde 8 Stdn. in einer Flasche geschüttelt, die organische Phase abgezogen, über Natriumsulfat getrocknet und der Rückstand mit 500 ml Petroläther (40-60°) gewaschen. Die vereinigten Extrakte wurden i.Vak. eingedampft, der Rückstand in 10 ml Petroläther (50-75°) aufgenommen und wie unten (S.66) beschrieben aufgetrennt.
Aus dem Ansatz konnten die folgenden Verbindungen isoliert werden:

2,3-Dimethyl-5-solanosyl-1,4-benzochinon (PQ-9):
Die Verbindung (Zone F1, Tabelle 17 S.35) kristallisierte in gelben Nadeln (50 mg). Schmp. 43°
Das Molekulargewicht wurde aus der Extinktion bei 255 mμ zu 756 bestimmt ($E^{1\%}$ = 198).
NMR-Spektrum: δ(ppm) 6,48 (1) - 2,02 (38) - 5,12 (9) - 3,13 (2) - 1,60 (30) in $CDCl_3$
Massenspektrum: m/e = 749 - 614 - 544 - 476 - 408 - 340 - 272 - 204 - 189 - 135
IR-Spektrum: ν(μ) 3,36 - 3,41 - 3,49 - 6,06 - 6,19 - 6,91 - 7,23 - 7,59 - 8,10 - 9,10 - 11,32 - 11,92

2-Methyl-3-phythyl-1,4-naphthochinon (Vitamin K_1):
Die Verbindung (Zone F12) wurde in System II von PQ-9 getrennt und als gelbes Öl isoliert.

Isolierung einiger p-Benzochinone vom Typ des PQ-B:
Aus 120 mg Chinonfraktion wurden 53 mg gelbes Öl (Zonen F2+F3) isoliert. Im System 1) Benzol/Petroläther (4:1) 2) CCl_4 auf

Kieselgel G (500 µ) wurden bei Vorversuchen folgende Rf-Werte beobachtet:

PQ-9	Rf: 0,69
F2+F3	0,54
F4	0,48

Kristallisationsversuche von F2+F3 verliefen ergebnislos. Die Zonen ließen sich in den verschiedensten Systemen nicht hinreichend voneinander trennen.
Die Werte der Molekulargewichtsbestimmungen aus der Extinktion bei 255 mµ waren nicht reproduzierbar.
Die Zonen wurden daraufhin gemeinsam weiter untersucht und zur Stabilisierung reduzierend acetyliert.

Reduzierende Acetylierung von F2+F3:

Dazu wurden 5-50 mg der Substanz mit 1 ml Acetanhydrid, 25 mg Zinkstaub und 0,2 ml Triäthylamin 3-5 Min. auf dem Wasserbad bis zur Entfärbung erwärmt, mit 5 ml Cyclohexan verdünnt, durch Glaswolle filtriert und die organische Phase abgetrennt. Man wäscht 2 mal mit 2,5 ml 0,3n Salzsäure und 3 mal mit 5 ml Wasser, dampft das Lösungsmittel ab und nimmt in 3 ml heißem absolutem Alkohol auf. Beim Abkühlen auf 3° und Versetzen mit einigen Tropfen Wasser konnten keine Kristalle erhalten werden.
Das Reaktionsprodukt wurde daraufhin in Chloroform rechromatographiert (18 mg; Rf. 0,74 auf 500 µ Kieselgel G).

Mikrohydrierung:

Einwaage (mg)	angenom. Mol.-Gew.	µ Mole Substanz	µ Mole H_2 aufgenom.	Zahl der Doppelbindungen in der Seitenkette
0,79	749	1,06	4,4	4,1
1,41	749	1,88	7,2	3,9

2,3-Dimethyl-5-solanosyl-hydrochinon-1,4-diacetat:

Diese Verbindung wurde zum spektroskopischen Vergleich benötigt und wie oben S.62 beschrieben durch reduzierende Acetylierung von PQ-9 dargestellt.

NMR-Spektrum: δ (ppm) 6,78 (1) - 5,17 (9) - 2,60 (2) - 2,32 (6) - 2,08 (38) - 1,62 (30) in $CDCl_3$

Das NMR-Spektrum des Hydrochinon-1,4-diacetats zeigt zwei Signale bei δ (ppm) = 7,13 (4) und 2,30 (6).

2,3-Dimethyl-5-solanosyl-hydrochinon:
Diese Verbindung (Zone F54) wurde bei der Rechromatographie des Rf-Bereiches 0,47-0,29 (System I) in Chloroform als farbloses Öl neben einer Reihe anderer EE-positiver Zonen isoliert.

2,3-Dimethoxy-6-methyl-5-decaprenyl-1,4-benzochinon:
Die Verbindung (Zone F61) wurde als gelbes Öl isoliert und zur Reinigung im System Benzol/1% Methanol rechromatographiert (Rf. 0,56 auf Kieselgel G)
In System III wurde eine weitere Zone F612 (Rf. 0,63) beobachtet, die bei der Kettenlängenbestimmung im gleichen System mit Q-7 zusammenlief.

2,3-Dimethyl-5-geranyl-1,4-benzochinon (PQ-4):
F7 wurde in den Systemen II und III mit synthetischem PQ-4 verglichen. Die Rf-Werte beider Verbindungen zeigten keinerlei Abweichung voneinander.

Isolierung einiger p-Benzochinone vom Typ des PQ-C und D:
Die Zone F8 trennte sich im System II in zwei Zonen (F81 und F82) auf, die wiederum im System III noch einmal in je zwei Zonen (F811, F812, F821 und F822) aufgetrennt wurden.

2,3,6-Trimethyl-5-(2'-dihydro-3'-hydroxyphythyl)-1,4-benzochinon (α-TQ):
Die Zone F91 verhielt sich im System II wie α-TQ, das zum Vergleich eingesetzt wurde.

Heptan-Propanol-Extraktion von Spinatblättern
750 g gewaschene und ausgelesene Spinatblätter wurden im Fleischwolf zerrissen und in einem handelsüblichen Entsafter abgepreßt (450 ml Preßsaft). Die Lösung wurde mit 4,15 g Natriumdihydrogenphosphat, 5,4 g Dinatriumhydrogenphosphat (Puffer pH 6,0) und mit 300 ml Heptan/Propanol (1:1) 2 Stdn. unter kräftigem Schütteln extrahiert (Nachextraktion 1 Std. mit 200 ml Petroläther 40-60°). Die vereinigten Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet, i.Vak. eingeengt, mit 5 ml Petroläther/CCl_4 (1:1) aufgenommen und wie unten S.66 beschrieben aufgetrennt.

2,3-Dimethyl-5-solanosyl-1,4-benzochinon (PQ-9):
Die Zone S1 lieferte 9,6 mg PQ-9. Schmp. 43°
Das Molekulargewicht wurde aus der Extinktion bei 255 mμ zu 721 bestimmt.

Isolierung einiger p-Benzochinone vom Typ des PQ-B:
Die Zonen S2 und S3, die sich im System I wenig (Rf: 0,71 und 0,67) und im System II gar nicht (Rf: 0,79) voneinander trennten, entsprechen den Zonen F2 und F3 der Fliederaufarbeitung. Ihre Rf-Werte liegen allerdings durchweg unter dem des PQ-9.

2,3-Dimethyl-5-dimethylallyl-1,4-benzochinon (PQ-1):
Die Zone S4, von der 2,4 mg gelbes Öl erhalten wurden, ließ sich bereits im System I gut von S2 und S3 abtrennen. Die Substanz verhält sich bei der Chromatographie auf paraffiniertem Kieselgel wie PQ-1. Sie ist in ihren chromatographischen Eigenschaften mit F4 identisch.

2,3-Dimethyl-5-solanosyl-hydrochinon (S52), Ubichinon-10 (S6), α-TQ (S9) und ein Chinon vom Typ des PQ-C (S8) wurden analog F54, F61, F9 und F81 isoliert und identifiziert.

Angaben über Farbreaktionen sowie UV-, IR- und NMR-Spektren sämtlicher hier aufgeführter Verbindungen finden sich im Kapitel C2b (S.34 ff) dieser Arbeit.

Petroläther-Propanol-Extraktion von Spinatchloroplasten:
10 kg gewaschene Spinatblätter wurden wie oben (S.63) beschrieben zerkleinert und entsaftet (6 l Preßsaft). Die Chloroplasten des Preßsaftes ließen sich unter Zusatz von festem Natriumchlorid in einer Durchlaufzentrifuge in kontinuierlichem Verfahren bei 1200 g sedimentieren. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug 130 ml/5 Min. Nach zweimaliger Zentrifugation hatte die Lösung einen Chlorophyllgehalt von 0,11 mg/ml, der in 200 ml Wasser aufgenommene Rückstand 2,55 mg/ml. Es wurden insgesamt 600 ml Chloroplastensuspension erhalten. Die Extraktion wurde nach Zusatz von 5,5 g Natriumdihydrogenphosphat und 7,2 g Dinatriumhydrogenphosphat mit 600 ml Petroläther/Propanol (1:1)

während 2 Stdn. durchgeführt (Nachextraktion 2 mal mit je 300 ml Petroläther jeweils 3 Stdn.).

Die vereinigten Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet, i.Vak. eingedampft, mit 5 ml Petroläther/CCl_4 (1:1) aufgenommen und wie unten (S.66) beschrieben aufgetrennt. Bei der Herstellung und Extraktion von Fliederchloroplasten wurde analog verfahren. Für einige Extraktionen wurden die Spinatchloroplasten nach der Methode von Arnon[1)] hergestellt.

Im Falle der Fliederchloroplasten wurden die Ergebnisse der Tabelle 17 S.35 reproduziert. Aus den Spinatchloroplasten konnte neben PQ-9 (Rf. 0,76 im System I) nur eine weitere LMB-positive Zone (Rf. 0,65) isoliert werden, die nicht näher untersucht wurde. Die UV-Spektren (255-260S/290 mμ) beider Verbindungen waren identisch.

Acetonextraktion von Spinatchloroplasten:
20 ml der oben (S.64) gewonnenen Chloroplastensuspension wurden 5 Stdn. lyophilisiert und mit 10 ml Aceton 2 Stdn. unter Schütteln extrahiert. Man filtrierte vom Rückstand ab und dampfte i.Vak. ein. Die Auftrennung des Rückstandes erfolgte wie unten (S.66) beschrieben.
Außer PQ-9 (Rf. 0,77 im System I) konnte nach dieser Aufarbeitungsmethode kein weiteres Chinon mehr isoliert werden.

Acetonextraktion von Spinatblättern:
500 g Spinatblätter wurden zerschnitten und im Starmix zerkleinert. Der entstandene Brei wurde im Mörser mit 150 g Seesand und 25 g Dinatriumhydrogenphosphat 20 Min. weiter zerrieben. Man kühlte im Becherglas auf 10° und fügte dann unter Rühren tropfenweise (100 ml in 10 Min.) 2 l auf -10° abgekühltes Aceton hinzu. Man ließ 1 Stde. im Kühlschrank absitzen und zentrifugierte dann 8 Min. mit 5000 Upm vom Rückstand ab. Der Extrakt, der ca. 25% Wasser enthielt, wurde i.Vak. eingedampft und 2,5 Stdn. gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde daraufhin pulverisiert und 1 Stde. mit 100 ml Petroläther (40-60°)

geschüttelt. Nach dem Filtrieren wurde die Lösung i.Vak. eingedampft und der Rückstand in 10 ml Petroläther/CCl_4 (1:1) aufgenommen und wie unten (S.66) aufgetrennt.
Die Chinonfraktion (Heptan/Äther 4:1) dieser Aufarbeitung enthielt folgende Chinone (Rechromatographie in Chloroform).

	Rf-Wert	UV-Spektrum (ox/red) λ (mμ)
PQ-9	0,71	255,260S/290
Chinon I	0,44	255,260S/290
Chinon II	0,35	255,260S/290
α-TQ	0,19	260,268

Die Chinone I und II wurden nicht näher untersucht.

Trennung und Isolierung von Chinonen:

Säulenchromatographie

30 g Kieselgel H (Merck) wurden mit 120 ml Petroläther/CCl_4 (1:1) angerührt und auf eine Säule (31 x 300 mm) gegeben. Die Masse wurde mit einem Glasstab innerhalb der Säule gleichmäßig verteilt und über Nacht zum Absitzen des Kieselgels stehen gelassen. Dann gab man 10 ml der obigen Extraktlösungen (enthaltend ca. 3 g Trockengewicht Substanz) mit einer Pipette auf die Säule. Eluiert wurde zunächst mit einem Petroläther/CCl_4 (1:1)-Gemisch während 5-8 Stdn. Das gesamte Chlorophyll bleibt dabei am Kopf der Säule zurück. Der Durchlauf (1. Fraktion) liefert etwa 100 ml gelbrote Lösung, die in der Hauptsache alle Karotine enthält. Die Fraktion wurde verworfen. Eluiert man anschließend mit einem Petroläther/Äther (4:1)-Gemisch 8-10 Stdn., erhält man ca. 300 ml gelbe Lösung. Diese 2. Fraktion (Chinonfraktion) besteht im wesentlichen aus einem Gemisch verschiedener Chinone und Hydrochinone. Sie wurd i.Vak. eingeengt (gelbes zähflüssiges Öl), in wenig Petroläther (40-60°) aufgenommen und an Dünnschichtplatten weiter aufgetrennt.

Dünnschichtchromatographie

Die Auftrennung der durch Säulenchromatographie erhaltenen Chinonfraktionen wurde an Glasplatten (20 x 20 cm) vorgenommen,

die mit einer 500 µ Schicht Kieselgel G (Merck) beschichtet waren. Zur Anfertigung dieser Platten wurden 45 g Kieselgel G mit 90 ml Wasser im Mörser angerührt und mit einer Beschichtungsvorrichtung (Firma Desaga) auf 5 Platten der erwähnten Größe aufgetragen. Die Platten wurden aufrechtstehend im Trockenschrank bei 110° 1 Std. aktiviert und anschließend zum Gebrauch in einem Exsikkator über Blaugel aufbewahrt.

Die in Petroläther (40-60°) gelösten Chinone wurden mit einer Breitbandpipette oder mit Pasteurpipetten auf die Schicht aufgebracht und in verschließbaren Glaskammern, die mit den verschiedenen Steigmitteln gesättigt waren, entwickelt. Die Laufstrecke betrug 16 cm. Die Laufzeit der Chromatogramme schwankt je nach verwendetem Lösungsmittelsystem zwischen 30 und 60 Min. Nach dem Entwickeln wurden die Platten 30 Min. zum Abdunsten der Lösungsmittel an der Luft (Abzug) aufbewahrt. Zum Sichtbarmachen der Chinone und Hydrochinone auf den Platten wurden dann die unten S.67 f. aufgeführten Sprühreagenzien verwendet.
Zur Isolierung der mit den verschiedenen Sprühreagenzien indizierten chinonhaltigen Zonen wurden diese mit einem Spatel von den Platten heruntergekratzt, gesondert aufbewahrt und mit Äther die Chinone aus dem Kieselgel herausgelöst. Der Äther wurde i.Vak. eingedampft und die gelben öligen Rückstände wenn möglich zur Kristallisation gebracht. Das gelang lediglich im Falle des PQ-9, alle anderen Chinone konnten nur in Form von öligen Produkten erhalten werden.

Farbreaktionen isoprenoider p-Benzochinone:

Leukomethylenblau(LMB)-Reagenz
0,2 g Methylenblau werden in 30 ml Wasser gelöst und unter Zusatz von 5 ml konz. Schwefelsäure und 0,1 g Zinkstaub reduziert. Die farblose Lösung wird durch Glaswolle filtriert und in Form eines schmalen Streifens am Rande der Schicht auf die Dünnschichtplatte aufgesprüht. Chinone bilden tiefblaue Flecken auf hellblauem Grund, die im Falle des Vitamin K_1 und des α-TQ erst nach einiger Zeit erscheinen. Die Nachweisempfindlichkeit ist $< 5\gamma$.

Emmerie-Engel(EE)-Reagenz
Lösung I: 2 proz. Lösung von α,α'-Dipyridyl in Chloroform.
Lösung II: 0,5 proz. Lösung von Eisen-III-chlorid in Wasser.
Die Dünnschichtchromatogramme werden nacheinander mit Lösung I und II besprüht. Hydrochinone färben sich rot an.

Phosphormolybdänsäure(PMS)-Reagenz
Sprühreagenz nach Merck. (Unspezifische Indizierung)
Man besprüht die Dünnschichtchromatogramme mit dem Reagenz und läßt die Platte 15 Min. bei 100° im Trockenschrank liegen. Eine Reihe von Substanzen einschließlich der Chinone geben dunkle Flecken.
Die Nachweisempfindlichkeit beträgt 0,5γ .

Rhodamin B-Reagenz
Sprühreagenz nach Merck. (Unspezifische Indizierung)
Das Reagenz wurde zum Sichtbarmachen der Diacetate (S.62) verwendet. Es bilden sich nach einiger Zeit hellrote Flecken auf rotem Grund.

Dam-Karrer(DK)-Test
1 ml geeignete (s.S.44) äthanolische Chinonlösung ergeben mit 5 proz. methanolischer Kalilauge eine intensive Blaufärbung. Der Farbstoff ist nicht beständig.
Die Nachweisempfindlichkeit beträgt 50γ /ml.

Craven(CT)-Test
Beim Versetzen von 1 ml geeigneter (s.S.43) äthanolischer Chinonlösung mit 3 Tropfen Cyanessigsäureäthylester und 1 ml einer Mischung von absolutem Äthanol/Ammoniak (1:1) erhält man eine intensive Blaufärbung. Der Farbstoff ist einige Stunden beständig.
Die Nachweisempfindlichkeit beträgt 150γ /ml.

UV-Spektroskopie:
Die UV-Spektren sämtlicher Verbindungen wurden mit einem selbstregistrierenden Gerät Beckman DB (Firma Beckman) in Äther bzw. zur Bestimmung des Molgewichtes mit dem Spektralphotometer

PMQ II (Firma Zeiss) in absolutem Äthanol aufgenommen. Zur Ermittlung des Reduktionsspektrums wurde die in absolutem Äthanol gelöste Substanz mit einigen Kristallen Natriumborhydrid reduziert und dann gemessen.

Molekulargewichtsbestimmung aus der UV-Extinktion:
Ca. 2,5 mg genau abgewogenen Chinons werden in 10 ml absolutem Äthanol gelöst. 0,1 ml dieser Lösung werden in einer Quarz-Küvette mit einer Pipette auf 3 ml aufgefüllt und die Extinktionsdifferenz (ΔE) von Maximum (255 mμ) und Minimum (220 mμ) bestimmt. Das Molekulargewicht errechnet sich dann aus folgender Formel:

$$M = \frac{a \cdot 1000 \cdot \alpha}{x \cdot E} \qquad \text{bzw.} \qquad M = 10 \cdot \frac{\alpha}{E^{1\%}}$$

a - Einwaage in g; ΔE - Extinktionsdifferenz von Maximum und Minimum; α - Molarextinktion (für Plastochinone 15000);
x - Verdünnung in ml; $\Delta E = E^{1\%}$ für a=1g und x=100ml

Katalytische Hydrierung:
0,8 - 1,2 mg des zu hydrierenden Chinons werden in den Seitenansatz eines konischen Warburggefäßes von 14 ml Gesamtvolumen gebracht. Im Hauptgefäß werden 3 ml Methanol und 5 mg Palladium auf Tierkohle (10% Pd) zur Vorhydrierung des Katalysators ca. 30 Min. in einer Wasserstoffatmosphäre geschüttelt. Dann bringt man das Chinon durch mehrmaliges Schwenken von Gefäß und Manometer ins Hauptgefäß und hydriert bei 20° unter Schütteln bis die Wasserstoffaufnahme beendet ist (nach ca. 2 Stdn.).

NMR-Spektroskopie:
Die Spektren der Chinone wurden mit einem Varian 60 MHz gerät (A60) in Deuterochloroform, NaOD oder D_2O aufgenommen.
Es wurden ca. 10-20 mg Substanz für ein Spektrum benötigt.

Darstellung einiger p-Benzochinone mit isoprenoider Seitenkette:
0,02 Mol des betreffenden Chinons werden in 10 ml absolutem Dioxan gelöst mit 50 mg Palladium auf Bariumsulfat (10% Pd) unter Rühren und Druck hydriert bis sich unter Bildung des Hydrochinons die gelbe Lösung entfärbt hat (nach ca. 30 Min.).

Es wird vom Katalysator abzentrifugiert, 1 ml Bortrifluorid-Ätherat und 0,01 Mol des Polyisoprenalkohols unter Stickstoff und Rühren tropfenweise hinzugegeben (Dreihalskolben) und 15 Min. auf 50° erwärmt. Dann wird das überschüssige Ätherat im Stickstoffstrom abgeblasen. Man läßt abkühlen, filtriert vom Katalysator ab, versetzt die Lösung mit 1 g Silberoxid und oxydiert 1 Stde. unter Rühren. Danach verdünnt man mit 50 ml Heptan, filtriert, wäscht 3 mal mit Wasser, trocknet über Natriumsulfat und engt i.Vak. ein. Der Rückstand (gelbbraunes Öl) wird in 5 ml Petroläther/Äther (7:1) aufgenommen und an einer Kieselgel H Säule (21 x 300 mm) getrennt (25 g Kieselgel H auf 100 ml Lösungsmittel).
Folgende Fraktionen werden aufgefangen:

Fraktion 1 (Petroläther/Äther 7:1): 30 ml (Reaktionsprodukte; 5 Stdn. Laufzeit)

Fraktion 2 (Petroläther/Äther 4:1): 40 ml (Unumgesetztes Chinon)

Beim Rechromatographieren der Fraktion 1 an Kieselgel G (0,5 mm Schichtdicke) in Benzol erhält man bei 2,3-substituierten p-Benzochinonen die in gleicher Menge entstandenen 5- und 5,6-substituierten Benzochinone als Reaktionsprodukte. Die Ausbeuten betragen rund 30% d.Th. bezogen auf die trisubstituierte Verbindung.
Zur Darstellung von in der Seitenkette gesättigten bzw. teilweise gesättigten Chinonen geht man entweder vom entsprechenden Alkohol aus oder hydriert nach erfolgter Kondensation 1 Stde. mit Pd/Bariumsulfat (10% Pd).
Die für die Kondensationen benötigten Hydrochinone der verschieden substituierten p-Benzochinone wurden nicht isoliert.
Folgende Verbindungen wurden insgesamt dargestellt (Die Rf-Werte beziehen sich auf das oben angegebene System):

2,3-Dimethyl-5-dimethylallyl-1,4-benzochinon (PQ-1): (XXII)
Aus 2,3-Dimethyl-hydrochinon und Dimethylallylalkohol als gelbes Öl (Rf: 0,48).

$C_{13}H_{16}O_2$ (204,3) Ber.: C 76,44 H 7,89
Gef.: C 75,15 H 7,75

Das Molekulargewicht ergab sich aus der Extinktion bei 255 mμ zu 202.
NMR-Spektrum: δ (ppm) 6,48 (1) - 5,18 (1) - 3,12 (2) - 2,01 (6) - 1,70 (6) in $CDCl_3$

2,3-Dimethyl-5,6-dimethylallyl-1,4-benzochinon: (XXIII)
Entstent neben (XXII) als gelbes Öl (Rf: 0,56).

$C_{18}H_{24}O_2$ (272,4) Ber.: C 79,37 H 8,88
Gef.: C 79,04 H 8,95

Das Molekulargewicht errechnet sich aus der Extinktion bei 260 mμ zu 276.
NMR-Spektrum: δ (ppm) 4,99 (2) - 3,20 (4) - 2,01 (6) - 1,72 (12) in $CDCl_3$

2,3-Dimethyl-5-methylbutan-(2)-1,4-benzochinon: (XXIV)
Aus 2,3-Dimethyl-hydrochinon und Dimethylallylalkohol analog (XXII) jedoch mit katalytischer Hydrierung nach erfolgter Kondensation. Die Verbindung wurde als gelbes Öl erhalten (Rf: 0,71).
NMR-Spektrum: δ (ppm) 6,53 (1) - 2,3 bis 2,65 (2) - 2,02 bis 2,65 (6) - 1,1 bis 1,35 (3) - 0,95 (6) in $CDCl_3$

2,3-Dimethyl-5,6-methylbutan-(2,2')-1,4-benzochinon: (XXV)
Entsteht neben (XXIV) als gelbes Öl (Rf: 0,87).
NMR-Spektrum: δ (ppm) 2,3 bis 2,65 (4) - 2,01 (6) - 1,1 bis 1,35 (6) - 0,95 (12) in $CDCl_3$

2,3,6-Trimethyl-5-dimethylallyl-1,4-benzochinon: (XXVI)
Aus 2,3,6-Trimethyl-hydrochinon und Dimethylallylalkohol als gelbes Öl (Rf: 0,63).
NMR-Spektrum: δ (ppm) 4,98 (1) - 3,20 (2) - 2,01 (9) - 1,70 (6) in $CDCl_3$

2,3-Dimethyl-5-citronellyl-1,4-benzochinon (PQ-2): (XXVII)
Aus 2,3-Dimethyl-hydrochinon und Citronello als gelbes Öl (Rf: 0,44).
NMR-Spektrum: δ (ppm) 6,47 (1) - 3,12 (2) - 2,02 (10) - 1,67 (9) - 5,11 (2) in $CDCl_3$

2,3-Dimethyl-5-farnesyl-1,4-benzochinon (PQ-3): (XXVIII)
Aus 2,3-Dimethyl-hydrochinon und Farnesol als gelbes Öl (Rf: 0,65).
NMR-Spektrum: δ (ppm) 6,54 (1) - 5,02 (3) - 3,21 (2) - 2,06 (14) - 1,67 (12) in $CDCl_3$

2,3-Dimethyl-5,6-farnesyl-1,4-benzochinon: (XXIX)
Entsteht neben (XXVIII) als gelbes Öl (Rf: 0,90).

2,3,6-Trimethyl-5-farnesyl-1,4-benzochinon: (XXX)
Aus 2,3,6-Trimethyl-hydrochinon und Farnesol als gelbes Öl (Rf: 0,73).
NMR-Spektrum: δ (ppm) 5,08 (3) - 3,20 (2) - 2,01 (17) - 1,62 (12) in $CDCl_3$

2,3-Dimethyl-5-phythyl-1,4-benzochinon: (XXXI)
Aus 2,3-Dimethyl-hydrochinon und Phythol als gelbes Öl (Rf: 0,52).
NMR-Spektrum: δ (ppm) 6,49 (1) - 5,17 (1) - 3,15 (2) - 2,02 (8) - 1,75 (3) - 1,21 (19) - 0,85 (15) in $CDCl_3$

2,3-Dimethyl-5,6-phythyl-1,4-benzochinon: (XXXII)
Entsteht neben (XXXI) als gelbes Öl (Rf: 0,57).

Die Ergebnisse der Farbteste und die Daten der UV-Spektren sämtlicher hier aufgeführter p-Benzochinone finden sich in Tabelle 29 S.55.

Zusammenfassung

Das Verhalten von Disalicylidendiaminen und Sulfo-disalicylidendiaminen, die durch Kondensation von Salicylaldehyd bzw. 5-Sulfosalicylaldehyd mit Diaminen verschiedener Kettenlänge hergestellt wurden, in photosynthetischen Reaktionen isolierter Chloroplasten und Chlorella pyrenoidosa wurde untersucht. 10^{-3} m Disulfo-disalicylidenpropandiamin (Sulfo-DSPD) hemmt photosynthetische, ferredoxin-abhängige Reaktionen wie die NADP- und Nitritreduktion in isolierten Chloroplasten. Die nicht ferredoxin-abhängigen Reaktionen mit Ferricyanid und Chinonen und die cyclische Photophosphorylierung mit PMS und Menadion werden dagegen nicht beeinflußt. Die Hemmstelle von Sulfo-DSPD in der Elektronentransportkette der Chloroplasten ergibt sich demnach zwischen Lichtreaktion I und Ferredoxin. Die Nitritreduktion im Dunkeln und damit die Nitritreduktion selbst wird nicht durch Sulfo-DSPD gehemmt, dagegen aber die Nitratreduktase aus Chlorella.

10^{-3} m DSPD hemmt die photosynthetische Kohlendioxyd-Assimilation in Chlorella pyrenoidosa zu etwa 50%. $5 \cdot 10^{-4}$ m DSPD hemmt die lichtabhängige Glucoseaufnahme unter Stickstoff von Chlorella zu 80 - 100%. Das ist ein weiterer Hinweis für die Beteiligung von Ferredoxin an der cyclischen Photophosphorylierung in vivo. 10^{-3} m DSPD hemmt jedoch überraschenderweise nicht die photosynthetische Nitritreduktion in Chlorella, dagegen aber die Nitratreduktion.

Die durch Heptan-Propanol-Wasser-Extraktion aus Spinat- und Fliederchloroplasten (Syringa vulgaris) isolierten p-Benzochinone wurden miteinander verglichen.

Beide Pflanzen enthalten Plastochinon-9 (2,3-Dimethyl-5-solanosyl-1,4-benzochinon), Plastochinon-B_{1-2}, Ubichinon-10 (2,3-Dimethoxy-6-methyl-5-decaprenyl-1,4-benzochinon) und α-Tocopherylchinon. Das natürliche Vorkommen von Plastochinon-1 wurde erstmals in Flieder nachgewiesen. Das von Folkers aus Spinat isolierte Plastochinon-3 wurde nicht gefunden. Flieder enthält zusätzlich Plastochinon-4, das bisher nur in Kastanienblättern aufgefunden wurde, Plastochinon-D und je ein weiteres Chinon des C- und D-Typs, außerdem Ubichinon-7. Es wurde versucht, aus den UV- und NMR-Spektren sowie aus dem chromatographischen Verhalten und aus Farbreaktionen, Aussagen über die Konstitution der nur in geringen Mengen zur Verfügung stehenden Nebenchinone (PQ-B_{1-2}, PQ-C_{1-2} und PQ-D_{1-2}) zu machen. Es handelt sich bei allen Verbindungen um trisubstituierte p-Benzochinone, die in β-Stellung zum Chinonteil eine isoprenoide Doppelbindung enthalten. Das neue Plastochinon-B_2 besitzt offenbar eine teilweise hydrierte Seitenkette wie aus seinem NMR-Spektrum hervorgeht. Die genaue Struktur dieser Plastochinone bleibt weiter unbekannt.
Zum chromatographischen- und spektroskopischen Vergleich wurden eine Reihe p-Benzochinone mit isoprenoiden Seitenketten synthetisiert.

Literaturverzeichnis

1) Allen, M.B., F.R. Whatley u. D.I. Arnon: Biochim. Biophys. Acta 32, 32 (1959)
2) Tanaka, M.T., T. Nakashima, A. Benson, H. Mover u. K.T. Yasunobu: Biochemestry 5, 1666 (1966)
3) Kofler, M.: Festschrift für E.C. Barell, S.199 Basel (1946)
4) Kofler, M., A. Langemann, R. Rüegg, L.M. Chopard, A. Rayroud u. S. Isler: Helv. Chim. Acta 42, 1283 (1959)
5) Trenner, M.R., B.M. Arison, R.E. Erickson, C.M. Shunk, D.F. Wolf u. K. Folkers: J. Amer. Chem. Soc. 81, 2026 (1959)
6) Bishop, N.J.: Plant Physiol. 33, suppl. 27
7) Kegel, L.P., M.D. Henninger u. F.L. Crane: Biochem. Biophys. Res. Comm. 8, 294 (1962)
   Dilley, R.A., L.P. Kegel u. F.L. Crane: Plant Physiol. 37 XL (1962)
   Henninger, M.D. u. F.L. Crane: Plant Physiol. 39, 598 (1964)
8) Katoh, S.: Nature 186, 533 (1960)
9) Gorman, D.S. u. R.P. Levine: Proc. Nat. Acad. Sci. 54, 1665 (1965)
10) Trebst, A. u. H. Eck: Z. Naturforschg. 18b, 105 (1963)
11) Bettoney, W.E., J.G. Burt u. H.J. Scheule: Abstracts 6th World Petroleum Congress, Frankfurt 1963, Sect. VI, Paper 22
12) Mason, A.T.: Chem. Ber. 20, 267 (1887)
13) Weil, H. u. K. Brimmer: Chem. Ber. 55, 301 (1922)
14) Trebst, A., H. Eck u. S. Wagner: In "Photosynthetic Mechanisms of Green Plants", National Academy of Sciences - National Research Council, Washington 1963
15) Ramirez, J.M., F.F. Del Campo, A. Paneque u. M. Losada: Biochim. Biophys. Acta 109, 79 (1965)
16) Kandler, O.: Z. Naturforschg. 9b, 625 (1954)
17) Trebst, A.: Z. Naturforschg. 18b, 817 (1962)
18) Katoh, S. u. A. San Pietro: Biochem. Biophys. Res. Comm. 24, 903 (1966)

19) Berzborn, R., W. Menke, A. Trebst u. E. Pistorius: Z. Naturforschg. 21b, 1057 (1966)
20) Losada, M.: In "Currents in Photosynthesis" Eds.: J.B. Thomas u. J.C. Goedheer, Woudschoten 1965, S.431
21) Trebst, A., E. Pistorius u. H. Baltscheffsky: im Druck
22) Urbach, W. u. W. Simonis: Biochem. Biophys. Res. Comm. 17, 39 (1964)
23) Tagawa, K., H.Y. Tsujimoto u. D.I. Arnon: Proc. Natl. Acad. Sci. 49, 567 (1963)
24) Sugino, Y. u. Y. Miyoshi: J. Biol. Chem. 239, 2360 (1964)
25) Ilosvay, L.: Z. Anal. Chem. 33, 222 (1894)
26) de Nardo, L.U.: Comptes rendus 188, 563 (1929)
27) Hatefi, Y. u. F. Quiros-Perez: Biophys. Biochim. Acta 31, 490 (1959)
28) Krogmann, D.W. u. E. Olivero: J. Biol. Chem. 237, 3292 (1962)
29) Eck, H. u. A. Trebst: Z. Naturforschg. 18b, 446 (1963)
30) Misiti, D., H.W. Moore u. K. Folkers: J. Amer. Chem Soc. 87, 1402 (1965)
31) Egger, K.: Planta 64, 41 (1965)
32) Tendille, C. u. C. Gervais: Ann. Physiol. vég. 5, 193 (1963)
33) Lichtenthaler, H.K. u. M. Calvin: Biochim. Biophys. Acta 79, 30 (1964)
34) Threlfall, D.R., W.T. Griffiths u. T.W. Goodwin: Biochim. Biophys. Acta 102, 614 (1965)
35) Dilley, R.A.: Analytical Bioch. 7, 240 (1964)
36) Craven, R.: J. Chem. Soc. 1605 (1931)
37) Dam, H.: Helv. Chim. Acta 22, 310 (1939)
38) Thompson, D.H.: Naturally Occuring Quinones, Academic Press, New York S.147 (1957)
39) Wood, J.H., C.S. Colburn, L. Cox u. H.C. Garland: J. Amer. Chem. Soc. 66, 1540 (1944)
40) Jeffreys, J.A.D.: J. Chem. Soc. 2153 (1959)
41) Shunk, C.H., J.F. McPherson u. K. Folkers: J. Org. Chem. 25, 1053 (1960)

42) Karrer, P.: Helv. Chim. Acta 22, 1146 (1939)
43) Flaig, W. u. J.Ch. Salfeld: Liebigs Ann. Chem. 618, 117 (1957)
44) Billeter, M. u. C. Martius: Biochem. Z. 333, 430 (1960)
45) Das, B.C., M. Lounasmaa, C. Tendille u. E. Lederer: Biochem. Biophys. Res. Comm. 21, 318 (1965)
46) Griffiths, W.T., J.C. Wallwork u. J.F. Pennock: Nature 211, 1037 (1966)

Lebenslauf

Am 20. September 1936 wurde ich als Sohn des technischen Angestellten Heinrich Burba in Walsrode/Hann. geboren. Nach 5 Jahren Grundschule besuchte ich seit Ostern 1950 das Gymnasium (neusprachlicher Zweig) in Walsrode und beendete meine Schulausbildung am 6. März 1957 mit dem Abitur.

Zum 1. November 1957 begann ich daraufhin das Studium der Chemie an der Universität Göttingen, legte am 3. November 1961 das Diplom-Vorexamen ab und fertigte im Anschluß daran im Organisch-Chemischen Institut der Universität unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Franck eine wissenschaftliche Arbeit "Zur biogeneseähnlichen Synthese von Dehydrolobelidionen" an.

Am 21. Dezember 1963 bestand ich dann das Diplom-Examen für Chemiker (Fachrichtung: Organische Chemie).

Seit März 1964 war ich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Trebst im Pflanzenphysiologischen Institut, Abt.: Biochemie der Pflanzen mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation beschäftigt.

Meinen akademischen Lehrern, den Professoren Brockmann, Franck, Glemser, Hilsch, Jost und Pirson, bin ich zu großem Dank verpflichtet.